

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



TESIS DOCTORAL

Multiplicación de virus en protoplastos y tejidos vegetales

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR
PRESENTADA POR

María Concepción Cruces de Abia

DIRECTOR:

Rodrigo Moreno San Martín

Madrid, 2015

BIBLIOTECA UCM



5306072119

T 581.2
CRV
mul

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE BIOLOGIA

MULTIPLICACION DE VIRUS EN PROTOPLASTOS

Y TEJIDOS VEGETALES



R 23.162

Tesis presentada para optar al Grado
de Doctor en Ciencias Biológicas

Ma CONCEPCION CRUCES DE ABIA

Madrid, 1978

Este trabajo ha sido realizado en la Sección de Virus Vegetales del Departamento de Virología del Instituto "Jaime Ferrán" de Microbiología del C.S.I.C.

Quiero agradecer al Profesor Dr. Miguel Rubio Huertos, director del citado Instituto y Jefe del Departamento de Virología, así como al Dr. Rodrigo Moreno San Martín, Investigador científico de la Sección de Virus Vegetales y director del presente trabajo, los consejos y sugerencias recibidos de ambos para la realización de este trabajo.

Al Profesor Dr. D. Dimas Fernandez Galiano, Catedrático de Microbiología de la Facultad de Biología de la Universidad Complutense de Madrid, por su amabilidad al hacerse cargo de la ponencia de esta Tesis Doctoral.

También quiero dar las gracias D. Federico García Hidalgo del Servicio de Microscopía Electrónica, a la Srta. Sacramento Peñalver y a todos los demás compañeros por las facilidades y ayudas que me han proporcionado.



I N D I C EPáginasCAPITULO I. INTRODUCCION

1. CONSIDERACIONES GENERALES	2
1.1. Los protoplastos vegetales	3
1.2. Los virus vegetales	9
1.3. Infeccion de protoplastos por virus	16
1.4. Citologia de los protoplastos infectados por virus	24
1.5. El uso de protoplastos para la replicacion viral	27
2. IMPORTANCIA DEL TEMA Y PLAN DE TRABAJO SEGUIDO	29

CAPITULO II. MATERIAL Y METODOS

1. MATERIAL BIOLOGICO EMPLEADO	34
1.1. Plantas utilizadas en la obtencion de protoplastos	34
1.2. Virus utilizados	34
1.3. Plantas de ensayo para la propagación de virus	35

	<u>Páginas</u>
2. OBTENCION DE PROTOPLASTOS	37
2.1. Metodo de Davey	37
2.2. Metodo de Prat y Poirier-Hamon	38
2.3. Metodo de Chupeau y colaboradores	39
2.4. Recuento de protoplastos	41
3. CULTIVO DE PROTOPLASTOS	41
4. INFECCION DE PROTOPLASTOS POR VIRUS	45
5. ENSAYOS DE INFECTIVIDAD	48
6. METODOS DE INOCULACION DE VIRUS	49
7. METODOS DE PURIFICACION DE VIRUS	50
7.1. Metodo de Moghal y Francki	51
7.2. Metodo de Lot	53
8. DETERMINACIONES ESPECTROFOTOMETRICAS	55
9. ELECTROFORESIS EN GEL DE POLIACRILAMIDA	56
9.1. Electroforesis de las proteinas virales	57
9.2. Electroforesis del ac. nucleico viral	60
9.3. Determinacion de pesos moleculares	62
10. MICROSCOPIA ELECTRONICA	63
10. 1. Técnicas de tincion negativa	63

	<u>Páginas</u>
10.2. Tecnicas de cortes ultrafinos	65
10.2.1. Cortes ultrafinos de protoplastos	69
10.3. Obtencion de cortes ultrafinos	71
10.4. Tincion de cortes ultrafinos	71

CAPITULO III. RESULTADOS EXPERIMENTALES

1. EXPERIENCIAS REALIZADAS CON PROTOPLASTOS	74
1.1. Obtencion de protoplastos	74
1.2. Cultivo de protoplastos	76
1.3. Microscopia electronica de protoplastos	78
1.3.1. Observacion de protoplastos sanos	78
1.3.2. Observacion de protopl. infectados	80
1.4. Infeccion de protoplastos por virus	83
2. EXPERIENCIAS REALIZADAS CON EL VIRUS DEL MOSAICO DEL NABO (TuMV)	86
2.1. Sintomatologia en plantas de ensayo	86
2.2. Purificacion del virus	87
2.3. Estudios espectrofotometricos	88
2.4. Determinacion de la proteina viral	91
2.5. Microscopia electrónica	94
2.5.1. Tincion negativa	94
2.5.2. Ultraestructura de tejidos infectados	95
2.6. Infeccion de protoplastos por TuMV	97

3. EXPERIENCIAS REALIZADAS CON EL VIRUS DEL MOSAICO AMARILLO DE LA JUDIA (BYMV)	101
3.1. Sintomatologia en plantas de ensayo	101
3.2. Purificacion del virus	102
3.3. Estudios espectrofotometricos	103
3.4. Determinacion de la proteina viral	106
3.5. Microscopia electronica	109
3.5.1. Tincion negativa	109
3.5.2. Ultraestructura de tejidos infectados	110
3.6. Infección de protoplastos por BYMV	112
4. EXPERIENCIAS REALIZADAS CON EL VIRUS ESFERICO	116
4.1. Sintomatologia en plantas de ensayo	116
4.2. Purificación del virus	117
4.3. Estudios espectrofotometricos	118
4.4. Características fisico-quimicas	120
4.5. Determinación del ac. nucleico viral	121
4.6. Microscopía electrónica	123
4.6.1. Tinción negativa	123
4.6.2. Ultraestructura de tejidos infectados	124
4.7. Infección de protoplastos por el virus	125

PáginasCAPITULO IV. DISCUSION

1. TRABAJO REALIZADO SOBRE PROTOPLASTOS	131
1.1. Producción de protoplastos	131
1.2. Sobre el cultivo de protoplastos	133
1.3. Microscopía electrónica de protopl. sanos	138
1.4. Infección de protoplastos por virus	140
1.5. Microscopía electr. de protopl. infectados	146
2. ESTUDIO PARTICULAR DE LOS VIRUS EMPLEADOS	150
2.1. Virus del mosaico del nabo	150
2.2. Virus del mosaico amarillo de la judía	156
2.3. Virus esférico (Cucumovirus)	161

<u>CAPITULO V. RESUMEN Y CONCLUSIONES</u>	166
---	-----

<u>CAPITULO VI. BIBLIOGRAFIA</u>	180
----------------------------------	-----

<u>CAPITULO VII. FIGURAS</u>	207
------------------------------	-----

CAPITULO I. INTRODUCCION

1. CONSIDERACIONES GENERALES

Los conocimientos sobre la replicación de virus vegetales en células huésped están mucho menos avanzados que en virus animales o bacterianos. La razón principal de este retraso es de orden técnico, pues hasta hace muy poco no ha sido posible desarrollar un sistema vegetal en el que todas las células puedan ser infectadas simultáneamente y donde la replicación posterior ocurra de forma más o menos sincrónica.

Una segunda dificultad con virus vegetales es la ineficacia al inocular o transmitir ciertos virus. Para muchos de ellos, que pueden ser transmitidos, la inoculación mecánica requiere unas $10^4 - 10^6$ partículas por cada célula que va a ser infectada; con virus multiparticulados, las cifras son aun mayores.

El primer paso hacia el conocimiento de la replicación viral fue introducido en virología cuando Ellis y Delbrück (1939) establecieron un procedimiento para inocular simultáneamente gran número de células de *Escherichia coli* con un bacteriófago eliminando la posibilidad de una infección secundaria. Con las células inoculadas de esta forma ya es posible seguir un ciclo replicativo completo del virus. Tales experimentos fueron una de las bases metodológicas de la actual virología bacteriana y animal.

Para aplicar este primer método a la virología

vegetal, el material experimental debe cumplir forzosamente dos requisitos:

- a) Una gran proporción de las células presentes deben ser infectadas simultaneamente.
- b) El material debe consistir en células simples y aisladas para facilitar la posibilidad de infección.

Por tanto, debe tratarse de cultivos celulares en suspensión, y para obtener una elevada frecuencia de infección en los tejidos vegetales habrá que destruir las rígidas paredes celulares, ésto es, usar protoplastos de plantas.

1.1. Los protoplastos vegetales

El aislamiento de protoplastos de plantas superiores fue ya señalado en 1892 y su fusión en 1937, sin embargo, este campo de investigación no ha empezado a tener importancia hasta la publicación del primer trabajo de Cocking (1960) empleando un método enzimático.

Mediante numerosas modificaciones (Cocking, 1972 Evans y col. 1972) se han obtenido protoplastos de gran variedad de tejidos como meristemos, mesófilo de hojas, órganos de reproducción, coleótilos, raíces, cotiledones, cultivo de callos...etc que han sido cultivados, regenerando una nueva pared celular, inducidos a fusionarse y crecer hasta el florecimiento de plantas.

La obtención de protoplastos por métodos enzimáticos está basada en la utilización de preparados de enzimas ricos en α -(1,4)-glucanasa ya que las paredes celulares de plantas superiores, normalmente, contienen celulosa, hemicelulosa, pectina y pequeñas cantidades de proteínas. Se han empleado celulasas obtenidas de *Tricoderma viride* que se pueden adquirir comercialmente.

Es importante indicar que los procedimientos usados para el aislamiento de protoplastos pueden tener, y de hecho tienen, efectos posteriores sobre el comportamiento de estas células desnudas.

Los protoplastos aislados, por ser células desprovistas de su pared celular, presentan problemas que normalmente no se producen en el cultivo de células vegetales. Necesitan mantenerse en un medio plasmolítico adecuado cuyo potencial osmótico requiere estar cuidadosamente ajustado y adaptado al sistema de protoplastos.

Factores ambientales, particularmente efectos de luz, pueden influir de modo decisivo en la estabilidad de los protoplastos obtenidos. Esto probablemente se debe a los cambios inducidos por la luz en el potencial osmótico interno, sobre todo si el sistema es potencialmente fotosintético. Los protoplastos suelen requerir luz para la captura de aminoácidos y uridina del medio externo (Francki y col. 1971) y también parece ser necesaria para la división de los

protoplastos (Takebe y Nagata, 1973). Por otro lado, los protoplastos no toleran periodos prolongados de gran intensidad lumínica, lo cual obliga a buscar unas condiciones óptimas de iluminación que suelen oscilar entre los 2000 y 3000 lux (Motoyoshi y col. 1973; Beier y Bruening, 1975) aunque pueden variar segun la planta utilizada y el destino posterior de los protoplastos aislados.

Los protoplastos para inocular virus vegetales se han obtenido, en su mayor parte, del mesófilo de hojas de tabaco; además de ser susceptible a una gran variedad de virus, las hojas de esta planta contienen gran número de células parenquimáticas.

Para un aislamiento rápido y eficaz de protoplastos utilizando enzimas, es necesario exponer el tejido a la acción enzimática; hay que separar previamente la epidermis inferior quitando mecánicamente trozos de dicha epidermis con la ayuda de unas pinzas (Takebe y col. 1968). De esta forma se han obtenido protoplastos de tabaco, habas, petunia, tomate...etc

Los métodos utilizados corrientemente para el aislamiento de protoplastos de mesófilo estan basados en el procedimiento de Takebe y col. (1968) que permite obtener gran número de células y protoplastos de parenquima. El proceso consta de dos etapas:

- Disociación del mesófilo de la hoja en células simples utilizando "pectinasa"(poligalacturonasa)
- Digestión de las paredes de las células aisladas mediante "celulasa"

Este sistema permite aislar 10^7 protoplastos de parénquima en empalizada por cada gramo (peso fresco) de hojas de tabaco en unas dos horas (Otsuki y col. 1974).

Se han realizado varias modificaciones del procedimiento original, entre ellas, la de realizar la digestión enzimática en un sólo paso, exponiendo el mesófilo de la hoja sobre una mezcla de pectinasa y celulasa que libera directamente los protoplastos (Kassanis y White, 1974).

Una modificación del método en dos pasos fue realizada por Watts y col. (1974): el mesófilo de la hoja se trató brevemente con pectinasa para ablandar pero no disociar el tejido que será posteriormente digerido por la celulasa.

Cuando los protoplastos se aíslan enzimáticamente degradando la pared celular, alguna de las enzimas presentes pueden tener efectos deletéreos sobre los protoplastos obtenidos. Esta es la razón por la que ciertos autores (Pilet, 1971; Pilet y col. 1972; Beier y Bruening, 1975) han utilizado métodos mecánicos de aislamiento.

El rendimiento de protoplastos activos está influenciado por la edad y estado fisiológico de la planta, así como por la posición de las hojas. La influencia de estos factores ha sido estudiada detalladamente por Watts y col. (1974). Por su parte, Shepard y Totten (1975) indican que las condiciones óptimas pueden variar con el método empleado en la obtención.

Recientemente, Cocking ha realizado un análisis crítico del desarrollo actual de los protoplastos vegetales basándose en que al ser células desnudas pueden crecer y dividirse, siendo capaces de resintetizar su pared celular y comportarse como un cultivo normal de células en suspensión (Cocking, 1970-1973a).

Los protoplastos han podido ser cultivados en medio líquido (Power y col. 1971; Gosch y col. 1975) cuyos nutrientes dependen de la especie vegetal utilizada e incluso de su variedad. En medio sólido utilizando agar (Kameya, 1972), han logrado dividirse y formar colonias (Frearson y col. 1973) llegándose a obtener plantas completas a partir de una sola célula (Nagata y Takebe, 1971; Shepard y Totten, 1975).

También los protoplastos son capaces de fusionarse y ya en 1968 se sugirió que la fusión "in vitro" de protoplastos, con la subsiguiente regeneración de plantas híbridas podría ser un buen sistema para introducir una mayor

diversidad genética en las plantas (Schenk y Hildebrant,1968 Nickell y Torrey,1969; Cocking,1973b).

En los últimos años, se han descrito varios métodos para producir la fusión de protoplastos (Power y col. 1970-1971; Keller y col. 1973), pero todas estas técnicas rinden una escasa frecuencia de fusión entre protoplastos de diferentes especies (Potrykus,1971; Carlson y col. 1972).

Este inconveniente ha sido resuelto recientemente por Kao y col. (1974) utilizando polietilén glicol (PEG) para obtener una alta frecuencia de fusión interespecífica de protoplastos. Por el momento se desconoce el mecanismo del proceso, pero parece ser que la electronegatividad del PEG hace a esta molécula capaz de formar puentes de hidrógeno con los grupos positivos del agua, proteínas, hidratos de carbono...etc. Este compuesto puede actuar como puente molecular entre las superficies de dos protoplastos adyacentes y producir una adhesión entre ellos. Al estar muy próximos, existe una gran superficie en íntimo contacto que posibilita una redistribución electrónica para unir grupos de distinta carga, pertenecientes a los dos protoplastos adheridos, resultando la fusión de los mismos (Burgess y Fleming,1974).

1.2. Los virus vegetales

Como nuestro trabajo tiene por objetivo principal el estudio de la multiplicación de los virus vegetales y concretamente la replicación viral en protoplastos, es imprescindible conocer las características propias de los virus, tema que desarrollamos a continuación.

Según Matthews (1970), un virus es un ser con una o mas moléculas templetas de ácido nucleico, DNA o bien RNA, con las siguientes propiedades:

a) Son capaces de organizar su propia replicación solamente en un medio intracelular adecuado. Para su replicación, el virus toma de la célula huésped ribosomas, RNA - transferente y un sistema productor de energía. Ciertos virus requieren también la presencia de otros virus.

b) En las partículas virales maduras, el material genético suele estar protegido por una cápsula de proteína o lipoproteína. Cuando el material genético es mas de una molécula de ácido nucléico, cada una puede estar en una partícula diferente o todas juntas en una sola. El virus maduro no posee mas ácido nucléico que su material genético.

Para iniciar el estudio de las virosis vegetales, es imprescindible comenzar con la identificación de los virus, lo cual se realiza determinando las características

propias de ellos o en relación con las plantas que parasitan.

En el simposium celebrado por la Sociedad de Fitopatología del Japón sobre identificación de virus de plantas, Inouye (1964) marca las pautas seguidas por él en la identificación de virus vegetales:

- Observación de los síntomas producidos y tipos de transmisión.
- Métodos de tinción empleados en microscopía electrónica.
- Estudio de las reacciones sobre plantas de ensayo.
- Métodos serológicos y de protección.

En España, Rubio-Huertos y col. (1967) identificaron algunos virus recogidos en diferentes regiones atendiendo a su:

- Sintomatología en plantas de ensayo
- Histología
- Forma y tamaño de las partículas de virus
- Tipos de transmisión
- Propiedades físico-químicas

Para la identificación de los virus utilizados en nuestro trabajo, hemos seguido las directrices de los autores españoles.

El conjunto de síntomas que presentan las plantas infectadas por virus es extremadamente variado. Pueden ser apenas perceptibles llegando hasta la rápida muerte de la planta, con diferentes grados intermedios.

En la mayoría de los vegetales, los síntomas varían con el virus y la especie huésped. Dependen en gran manera de las condiciones ambientales, y así pueden ser patentes durante las estaciones frías y desaparecer temporalmente durante el tiempo cálido (Hanson y Kreitlow, 1953).

Atendiendo a la sintomatología, existe gran cantidad de literatura describiendo enfermedades de plantas producidas por virus (Bos, 1970; Holmes, 1964). Los síntomas producidos pueden ser de dos tipos:

a) Síntomas locales: son lesiones localizadas que se desarrollan cerca del punto en que tuvo lugar la penetración del virus. No alteran significativamente la economía celular y son de gran utilidad para ensayos biológicos de infectividad. Pueden formar manchas cloróticas o necróticas, anillos, bandas...etc

b) Síntomas generalizados: el virus se extiende por toda la planta siendo transportado por la savia y altera el metabolismo total. Pueden distinguirse:

- Mosaico
- Anillos y bandas concéntricas
- Aclaramiento y bandeado de venas

- Clorosis
- Necrosis
- Distorsiones y deformaciones
- Crecimientos anormales
- Anormalidades en flores y frutos

Estos últimos síntomas son producidos por una destrucción y modificación de los constituyentes normales de las células y tejidos.

Al mismo tiempo, en algunas virosis, aparecen células parasitadas que contienen unos cuerpos extraños o inclusiones típicas, muy características de los virus vegetales y que también son producidas por ciertos virus animales. Así, ya en 1869, Rivolta observó estas inclusiones en aves de corral atacadas por virus y Guarnieri en la viruela. Negri (1903) describió estructuras anormales (inclusiones) en células cerebrales de animales atacados por la rabia (cuerpos de Negri). La producción de inclusiones en plantas es motivada por la infección de virus, siendo de considerable valor diagnóstico y dependen mucho más del virus infectivo que de la planta infectada.

Fue Iwanowski (1903) el primero en hacer un estudio histopatológico de una planta infectada por virus, describiendo unas inclusiones amorfas y otras cristalinas. Los cuerpos de inclusión amorfos que forma el virus del mosaico

del tabaco fueron llamados por Goldstein (1924) "cuerpos X", término que se ha extendido a las inclusiones amorfas inducidas por virus. En general son redondeados u ovoideos, frecuentemente vacuolados y tienen un tamaño de 1 a 30 micras. Están localizados en el citoplasma y raramente en el núcleo. Dan las reacciones normales de proteínas y se tiñen bien con colorantes ácidos. Su estructura varía dependiendo de los distintos virus, y la influencia de las plantas huésped no es muy significativa.

De acuerdo con su estructura vista al microscopio óptico, Rubio-Huertos (1972) ha clasificado estos "cuerpos de inclusión amorfos" en los siguientes grupos:

A) Inclusiones amorfas en el citoplasma

(1). Granulares, redondeadas y homogéneas; a veces están vacuoladas o dispersas, dependiendo de la edad de la inclusión.

(2). Fibrilares con cuerpos bien desarrollados semejantes a agujas; también contienen mitocondrias, plastidios y gotas de lípidos (Sheffield, 1931-1934; Rubio-Huertos, 1950).

(3). Ameboides y vacuolados con puentes bien definidos (Goldstein, 1924).

(4). Redondeadas, ovaladas o alargadas, muy refringentes cuyo contorno aparece muy bien definido y no están vacuoladas (Rubio-Huertos, 1956; Robb, 1964).

(5). Tipos extraños de inclusiones que suelen estar asociadas a infecciones virales especiales (Littau y Black, 1952).

B) Inclusiones amorfas en el núcleo

(6). CuerpoX granular, grande y redondo (Tsao, 1963)

(7). Inclusiones granulares restringidas al nucleolo (Bos y Rubio-Huertos, 1969).

Los "cuerpos cristalinos de inclusión", pueden agruparse en:

A) Inclusiones cristalinas en el citoplasma

(1). Numerosos cristales con lados curvos y a veces exágonos perfectos (Porter y Mc Whorter, 1952).

(2). Grandes láminas que a veces pueden ser para - cristalinas, en forma exagonal (Iwanowski, 1903).

(3). Masas cristalinas formando agujas o fibrillas largas (Amelunxen, 1958).

(4). Pirámides con base exagonal, o romboedros (Rubio-Huertos, 1950-1956).

B) Inclusiones cristalinas en el núcleo

(5). Láminas rectangulares delgadas (Kassanis, 1939; Matsui y Yamaguchi, 1964).

(6). Cristales isométricos limitados al nucleolo (Mc Whorter, 1941).

(7). Otras inclusiones cristalinas (Woods y Eck, 1948; Goldin, 1963).

Esta agrupación de los cuerpos de inclusión según su aspecto al microscopio de luz, es una gran simplificación puesto que se trata de estructuras cambiantes. Ciertos virus producen cuerpos X que son granulares al principio y se vuelven fibrilares para formar finalmente una inclusión cristalina. Por otro lado, razas de un mismo virus pueden producir diferentes tipos de inclusión (Rubio-Huertos, 1962).

Mediante pruebas citoquímicas y tinciones específicas, se ha comprobado que los cuerpos de inclusión son nucleoproteínas. Algunas inclusiones amorfas también contienen lípidos y orgánulos celulares, tales como mitocondrias, plastidios y cloroplastos (Rubio-Huertos, 1967).

El microscopio electrónico ha sido de gran utilidad en el estudio de la ultraestructura y composición de los cuerpos de inclusión. La mayor parte de las inclusiones amorfas inducidas por diferentes virus son, en realidad, el sobrecrecimiento de una masa de citoplasma introduciéndose en la vacuola central de la célula. Dentro de estas inclusiones hay masas de partículas de virus distribuidas de diferentes formas según el virus. Las inclusiones están rodeadas por una membrana citoplasmica o el tonoplasto, y la mayoría de ellas también poseen vacuolas.

5306072 119

1.3. Infección de protoplastos por virus

En los estudios sobre virología de plantas, Zaitlin (1959) fue el primero en advertir la replicación viral en células de tejido foliar de tabaco que habían sido infectadas con el virus del mosaico del tabaco y separadas posteriormente por digestión enzimática de la laminilla media mediante una pectinasa comercial.

La primera inoculación real de protoplastos fue realizada por Cocking (1966), con frutos de tomate utilizando también el virus del mosaico del tabaco como inóculo, aunque sin una clara evidencia de que se hubiera producido una activa replicación viral.

En 1969, científicos de dos laboratorios confirmaron los experimentos anteriores logrando la infección por el virus del mosaico del tabaco de protoplastos de frutos de tomate (Cocking y Pojnar, 1969) y hojas de tabaco (Takebe y Otsuki, 1969).

El procedimiento desarrollado por estos últimos autores ha sido usado para infectar gran número de protoplastos con una concentración baja de virus. Estudios posteriores (Takebe y col., 1971; Otsuki y col., 1972) pusieron de manifiesto que se había logrado la multiplicación vigorosa del virus del mosaico del tabaco en los protoplastos inoculados.

TABLA - I

VIRUS USADOS PARA INOCULAR PROTOPLASTOS DE TABACO			
VIRUS	ESPECIE DE TABACO	% PROTOPLASTOS INFECTADOS	AUTORES
TMV	Bright yellow	30	Takebe y Otsuki
	Xanthi	90	Otsuki y col.
	Xanthi nc	37 y 80	Hibi y Yora Coutts y Cocking
	Samsun	84	Otsuki y col.
	Samsun NN	89	Otsuki y col.
	White Burley	40 y 80	Motoyoshi y col. Kassanis y White
TMV-RNA	Bright yellow	7	Aoki y Takebe
	Samsun	90	Sarkar y col.
CMV	Xanthi	90	Otsuki y Takebe
PVX	Burley 21	16	Shalla y Petersen
	Xanthi	70	Otsuki y col.
CCMV	White Burley	65	Motoyoshi y col.
CCMV-RNA	White Burley	31	Motoyoshi y col.
PEMV	White Burley	90	Motoyoshi y Hull
PEMV-RNA	White Burley	3	Motoyoshi y Hull
BMV (V5)	White Burley	77	Motoyoshi y col.

(Continua)

VIRUS	ESPECIE DE TABACO	% PROTOPLASTOS INFECTADOS	AUTORES
AMV	White Burley	35	Motoyoshi y col.
TRV	Xanthi	98	Kubo y col.
CPMV	Samsun NN	80	Hibi y col.
CGMMV	Xanthi	70	Sugimura, no publ.

Abreviaturas:

AMV = virus del mosaico de la alfalfa

BMV = virus del mosaico del Bromus

CCMV = virus del moteado clorótico de la vigna

CGMMV = virus del mosaico y moteado verde del pepino

CMV = virus del mosaico del pepino

CPMV = virus del mosaico de la vigna

PEMV = virus del mosaico y excrecencia del guisante

PVX = virus X de la patata

TMV = virus del mosaico del tabaco

TRV = virus del acorchado rizado del tabaco

TABLA - II

VIRUS USADOS PARA INOCULAR PROTOPLASTOS DE DIFERENTES PLANTAS SUPERIORES (NO TABACO)			
VIRUS	PLANTA	% PROTOPLASTOS INFECTADOS	AUTORES (no publicado=x)
TMV	Tomate, fruto	40	Cocking y Pojnar
	Tomate, hoja	50	Motoyoshi (x)
	Petunia	47	Hibi (x)
	Vigna	48	Hibi (x)
	Vinca		Takebe y Otsuki(x)
CMV	Vigna	95	Hibi y col. Koike y col.
	Vinca	48	Takebe y Otsuki(x)
CPMV	Vigna	60 y 96	Hibi y col. Beier y Bruening
CPMV-RNA	Vigna		Beier y Bruening
AMV	Vigna	6	Hibi (x)
BMV	Cebada	30	Furusawa (x)

Desde entonces, protoplastos de diferentes plantas han sido inoculados con éxito por otros virus y se está empezando a recopilar información relativa al proceso de infección en células individuales. Hasta el momento se han inoculado seis especies de plantas con diez virus diferentes, según puede observarse en las Tablas I y II.

Un factor importante de la alta frecuencia de infección es la adición de un polí-cati_on de elevado peso molecular a la solución inóculo de virus. La poliornitina (polímero lineal de un aminoácido básico, la ornitina) es el de mayor aplicación para este uso. Se cree que la poliornitina se une a las partículas de virus, cargadas negativamente, para formar el "complejo virus-poliornitina" (Takebe y col. 1974), favoreciendo la adsorción y penetración del virus en los protoplastos (Otsuki y col., 1972).

Otra ventaja del uso de protoplastos para el estudio de la multiplicación viral es la facilidad con que se puede determinar el número de células infectadas utilizando anticuerpos fluorescentes, concretamente el isotiocianato de fluoresceína (Nagaraj, 1962).

La eficacia de infección en protoplastos se define como la relación entre el número de partículas de virus en el inóculo y el número de células infectadas. Como la frecuencia de infección de un virus determinado es una funci_on

logarítmica de la concentración de dicho virus, las inoculaciones a baja concentración resultan muy eficaces. Así, la eficacia de infección del virus del mosaico del tabaco es de 80.000:1 a una concentración de inóculo de 1 ug/ml y de 2.500:1 a 0,01 ug de virus/ml. La eficacia de infección de este virus en tejido foliar no ha sido determinada con exactitud, pero parece ser del orden de 1.000.000:1 (Siegel y Zaitlin, 1964). Por tanto, los protoplastos son definitivamente superiores a los tejidos con respecto a la eficacia de infección.

La frecuencia de infección de protoplastos depende en gran manera de la concentración de virus usada para inocular. Con el virus del mosaico del tabaco, el virus del mosaico del pepino y el virus X de la patata, el número de células que llegan a ser infectadas es, a groso modo, proporcional al logaritmo de la concentración de virus, pero a concentraciones demasiado elevadas, decrece la infección (Takebe y Otsuki, 1969; Hibi y Yora, 1972).

La magnitud de la infección también depende de la infectividad específica del purificado de virus utilizado para inocular protoplastos y hay que hacer notar que las preparaciones purificadas de virus de plantas contienen, a menudo, gran número de partículas no-infectivas (Furumoto y Wildman, 1963).

Otro factor que influye en la infección es el pH del medio de inoculación. Su valor óptimo suele estar muy próximo a 5,0 porque los protoplastos empiezan a ser inestables por debajo de este valor. Sin embargo, se ha observado que la infección por el virus X de la patata (Otsuki y col. 1974) y el virus del acorchamiento rizado del tabaco (Kubo y col. 1974) es relativamente insensible al pH.

Así mismo, la infección de protoplastos resulta más satisfactoria si inmediatamente antes de la inoculación se lavan los protoplastos para eliminar posibles inhibidores de la infección (Otsuki y col. 1972).

El éxito de la infección también puede estar influenciado por la edad de la planta y la posición de las hojas de que han sido aislados los protoplastos (Motoyoshi y col. 1975a). Los investigadores no se ponen de acuerdo sobre la edad y tamaño óptimos de las hojas para el aislamiento de protoplastos y cada cual utiliza el material que mejor se adapta a sus experiencias.

La infección de protoplastos por virus se estabiliza mediante inoculaciones en un tiempo corto. Así, la replicación puede ocurrir de forma sincrónica con el rango de variación propio de la actividad metabólica de cada célula particular, ya que los protoplastos representan una población homogénea de células.

La curva de crecimiento de un virus en protoplastos, sigue el curso de una replicación viral típica en células individuales infectadas. Se trata de un crecimiento exponencial que disminuye gradualmente, pero se mantiene unas 72 horas (Coutts y col. 1972).

Mediante estudios citológicos de protoplastos infectados se ha observado el proceso de entrada de virus examinando secciones de protoplastos inmediatamente después de la inoculación. Cocking (1966) descubrió que las partículas de virus empezaban a unirse al plasmalema invaginado. También había partículas en vesículas del citoplasma y Cocking interpretó estas observaciones como indicativas de que el virus entraba por un proceso similar a la pinocitosis (Cocking, 1970).

En investigaciones posteriores también se han observado partículas virales adsorbidas a la membrana que se invagina en el lugar de contacto del virus, así como vesículas conteniendo partículas de virus (Honda y col. 1974; Takebe y col. 1974).

Es interesante indicar que los virus con morfología lineal siempre se adsorben por un extremo (Cocking, 1966; Hibi y Yora, 1972) pero aún no se sabe si la capacidad de adsorción reside en un solo extremo o en los dos.

Sobre esta base, Tekebe y col. (1974) postulan que la adsorción de un virus, probablemente en la forma del "complejo virus-poliornitina" induce actividad endocítica en la membrana del protoplasto.

Una idea bastante diferente en cuanto al proceso de entrada de los virus ha sido defendida por Burgess y col. (1973a-1973b) basándose en sus observaciones al microscopio electrónico. Pudieron apreciar varios tipos de lesiones en la membrana de protoplastos inoculados, y que el virus se unía preferentemente en los lugares donde la membrana estaba dañada. Estima que la poliornitina daña el plasmalema y el virus penetra directamente, antes de que la lesión haya sido reparada.

Por su parte, Motoyoshi y col. (1975a) presenta evidencias que defienden la naturaleza no-fisiológica del proceso de entrada del virus como son, el hecho de que la infección puede ocurrir a baja temperatura y en presencia de ácidos, condiciones que podrían suprimir o alterar el metabolismo energético celular.

1.4. Citología de los protoplastos infectados por virus

En general, la distribución de los virus que se han multiplicado dentro de protoplastos es similar a la de células infectadas en el tejido.

El virus del mosaico del tabaco (Hibi y Yora, 1972) y el virus X de la patata (Otsuki y col. 1974) forman grandes agregados, mientras que el virus del moteado clorótico de la vigna (Motoyoshi y col. 1973) y el virus del mosaico de la vigna (Hibi y col. 1975) están mas o menos dispersos por el citoplasma. Sin embargo, la distribución del virus del mosaico del pepino en protoplastos es extraña puesto que dicho virus se acumula en el núcleo además de en el citoplasma (Honda y col. 1974).

En cuanto a los efectos de la infección sobre la ultraestructura del protoplasto, los primeros trabajos de Cocking y Pojnar (1969) señalaron una extensa degradación del citoplasma, pero esto no se ha vuelto a mencionar en trabajos más recientes.

Honda y col. (1974) demostraron que el citoplasma, cloroplastos y mitocondrias de protoplastos de tabaco son bastante normales tras inocularlos con el virus del mosaico del pepino, aunque los núcleos presentan cierta morfología extraña. Esto está en marcado contraste con los desórdenes en la ultraestructura celular que acompañan la infección de tejido foliar por el virus del mosaico del pepino (Honda y Matsui 1974).

Algunos cambios ultraestructurales típicos de la infección viral se reproducen en protoplastos. Los cuerpos laminares de inclusión característicos de la infección por el

virus X de la patata (Shalla y Shepard, 1972) se forman también en protoplastos de tabaco (Shalla y Petersen, 1973; Otsuki y col. 1974), y la "estructura citopática" peculiar aparece en protoplastos de *Vigna sinensis* infectados con el virus del mosaico de la vigna (Hibi y col. 1975).

La alta frecuencia de infección y su naturaleza sincrónica, hacen posible seguir la génesis y decadencia de estas estructuras y correlacionarlas con la replicación de los virus. La observación de que los cuerpos de inclusión del virus X de la patata aparecen después de que se han acumulado grandes cantidades de virus en el citoplasma, conduce a Shalla y Petersen (1973) y a Otsuki y col. (1974) a establecer que estas estructuras no están implicadas en la replicación viral.

Burgess y colaboradores (1974a-1974b) han observado cambios ultraestructurales que acompañan a la infección de protoplastos por ciertos virus, consistentes en la proliferación y modificación del retículo endoplasmico y de la membrana nuclear. Antes de que se produzca la descendencia del virus, aparecen vesículas conteniendo un material fibrilar que en el caso del virus del mosaico y las excrecencias del guisante contiene RNA.

Algunos de los descubrimientos realizados recientemente sobre los mecanismos básicos de la infección y

replicación de los virus vegetales, no se habrían podido llevar a cabo sin la utilización de protoplastos. En particular, los estudios sobre la replicación viral a nivel molecular serían muy difíciles sin este sistema. Por tanto, no es extraño que los protoplastos se esten convirtiendo en uno de los materiales "standard" de laboratorio en las investigaciones sobre virus de plantas.

1.5. El uso de protoplastos para la replicación viral

Dado que los protoplastos son una forma no usual y que no se producen en ambientes naturales, deben ser mantenidos en un medio hipertónico que suele diferir nutricionalmente del medio en que normalmente se hallan las células vegetales.

Aunque los protoplastos aislados parecen ser muy normales en cuanto a su ultraestructura (Takebe y col. 1973) y metabolismo (Sakai y Takebe, 1970), hay algunos indicios de que su metabolismo está influenciado por el factor osmótico (Jones y col. 1973; Lázar y col. 1973). Concretamente, la observación de que el choque osmótico trae consigo un incremento en el nivel de ribonucleasa puede tener serias consecuencias en cuanto al uso de protoplastos en la investigación de virus vegetales. Sin embargo, la vigorosa replicación viral en protoplastos de mesófilo es un hecho bien demostrado con numerosos virus. Es probable que la ribonucleasa

inducida por las condiciones hiperosmóticas esté encerrada en estructuras como los ribosomas (Matile, 1969) y por tanto no interfiere en la síntesis del RNA-viral.

La ventaja más importante de los protoplastos en el estudio de los virus vegetales es que permiten el crecimiento de virus de forma que sus estados sucesivos de replicación en células individuales pueden ser identificados, seguidos y analizados. Sin experiencias desarrolladas de este modo, es imposible conocer la cinética de los procesos en vueltos en la replicación viral, puntualizar el grado en que se alteran por un tratamiento dado, o relacionar a un determinado huésped con un estado particular de replicación. En suma, los protoplastos permiten atacar estos problemas bajo condiciones bien definidas, simples y uniformes, porque son células sencillas, aisladas y libres de la posible influencia de otros tejidos.

Otra gran ventaja de los protoplastos deriva de su posibilidad de formar una suspensión uniforme en medio líquido. Se pueden obtener cantidades alícuotas cuali y cuantitativamente por simple pipeteo de una suspensión de células de densidad conocida. Además, volver a recuperar los virus asociados a moléculas o estructuras es relativamente fácil por la ausencia de paredes rígidas. Todas estas condiciones favorables están ausentes en los materiales y tejidos utilizados convencionalmente, pudiendo ser explotadas en los nuevos estudios sobre virología de plantas.

2. IMPORTANCIA DEL TEMA Y PLAN DE TRABAJO SEGUIDO

Los virus cuando infectan un organismo no se comportan como otros parásitos, tales como las bacterias, que se reproducen por simple división aprovechando los metabolitos que encuentran ya formados en la célula. Ellos actúan de forma diferente, pues no utilizan la célula como un simple medio de cultivo sino que desvian el metabolismo de la célula huésped infectada y lo dirigen hacia la síntesis de sus propios componentes virales.

Los síntomas tan variados que presentan las plantas infectadas por virus, se corresponden con una serie de modificaciones internas y destrucción del tejido normal o del contenido celular. La multiplicación del virus dentro de la célula y las alteraciones metabólicas producidas se traducen en modificaciones histológicas y citológicas, en algunos casos, de tal naturaleza que ocasionan la muerte de la planta y casi siempre un retraso o disminución del desarrollo.

Gracias al descubrimiento del microscopio electrónico y al posterior perfeccionamiento en la resolución del mismo junto a las técnicas de preparación de muestras, se han realizado muchas fructíferas investigaciones sobre la ultraestructura interna o externa de las partículas de virus así como su localización y efectos en las células que parasitan.

El empleo de estas técnicas convencionales junto con la introducción del uso de los protoplastos vegetales en los cuales se puede observar la multiplicación simultánea de los virus, nos ha permitido realizar investigaciones de tipo citopatológico en estos sistemas, así como la comparación entre plantas y protoplastos infectados por diferentes virus. Esperamos que nuestros resultados contribuyan a un me jor conocimiento de estos problemas de la Biología Celular en las plantas infectadas por virus.

Por eso, en este trabajo que constituye nuestra Tesis Doctoral, pretendemos estudiar el modo de acción de los virus en la célula vegetal y cómo ocurre su replicación en protoplastos aislados de plantas superiores.

Los virus de plantas poseen RNA en su molécula, excepto un pequeño grupo que tienen DNA, y por tratarse de nucleoproteínas pueden obtenerse en estado puro, a partir de plantas infectadas, mediante diferentes métodos. Sin embargo, el lugar de síntesis del ácido nucleico y proteína que los forman, y cómo se originan estas partículas en la célula, es un problema que aun está sin resolver.

Para estudiar estos problemas desde un punto de vista morfológico, hemos realizado estudios al microscopio electrónico que nos permiten una visión directa de la ultraestructura y modificaciones funcionales de las células infecti

tadas por virus y de los orgánulos que se encuentran en las mismas, con el fin de que la localización de las partículas virales en la célula nos ayude a comprender cómo se realiza la multiplicación de los virus estudiados.

Paralelamente a estos estudios citológicos, y con el mismo fin, hemos caracterizado y aislado una serie de virus que nos han servido de inóculo para infectar protoplastos donde poder observar la replicación del virus en estados sucesivos, utilizando cortes ultrafinos.

Podemos concretar el plan de trabajo seguido en los siguientes puntos:

1º) Obtención y cultivo de protoplastos; siguiendo las directrices de Takebe y col. (1968) y de Shepard y Totten (1975) que han conseguido rendimientos muy elevados en estos procesos.

2º) Aislamiento y caracterización de los virus utilizados; a partir de plantas de ensayo, cultivadas en invernadero, inoculadas mecánicamente y pudiendo aislar los virus mediante métodos físico-químicos, estudiando así mismo sus características.

3º) Infección de protoplastos; por incubación de los protoplastos aislados junto con un purificado de virus en presencia de poliornitina (Coutts y col. 1972), técnica habitualmente empleada para producir la infección viral.

4º) Microscopía electrónica; tanto de las hojas infectadas como de los protoplastos inoculados, realizando un estudio comparativo de ambos procesos.

5º) Ensayos de infectividad de los protoplastos infectados; mediante su homogeneización para servir como inóculo en ensayos locales sobre hojas de plantas testigo, estudiando los síntomas producidos.

Consideramos que los trabajos realizados, aparte del interés puramente científico, tienen importancia en cuanto conciernen a la epidemiología de unos virus tan extendidos como los que hemos estudiado y que producen enormes pérdidas anuales en los cultivos, atacando a un extenso número de plantaciones agrícolas.

CAPITULO II. MATERIAL Y METODOS

1. MATERIAL BIOLOGICO EMPLEADO

1.1. Plantas utilizadas en la obtención de protoplastos

Para el aislamiento de protoplastos de plantas superiores, hemos empleado tres especies vegetales:

- Nicotiana tabacum, var. "White Burley"
- Matthiola annua
- Vicia faba, var. "Aguadulce"

1.2. Virus utilizados

Los virus vegetales con que hemos realizado nuestras experiencias han sido los siguientes:

- El virus del mosaico del nabo (turnip mosaic virus): es de tipo helicoidal, alargado y flexuoso, perteneciente al grupo Y de la patata. Fue obtenido a partir de plantas de alhelí encontradas en Madrid que presentaban un mosaico acusado en las hojas y deformación de las mismas.

- El virus del mosaico amarillo de la judía (bean yellow mosaic virus): también de simetría helicoidal, alargado y flexuoso, perteneciente al grupo Y de la patata.

Se trata de un virus muy extendido, causando graves daños a los cultivos de leguminosas.

- Un virus de simetría icosaédrica: no caracterizado, procedente de un cultivo de espinacas de Valencia y Aranjuez que presentaba síntomas generalizados de mosaico y deformación de las hojas, acompañados de una notable reducción en el desarrollo de la planta. Este virus nos ha parecido interesante porque podría tratarse de una nueva raza del "virus del mosaico del pepino" (cucumber mosaic virus), mucho más estable que las estirpes hasta ahora conocidas.

1.3. Plantas de ensayo para la propagación de virus

Para el estudio de la sintomatología y citología producidas por los virus objeto de nuestro trabajo, utilizamos diversas plantas de ensayo donde inoculamos mecánicamente los virus a estudiar. Dichas plantas se han mantenido en invernadero a temperatura constante de unos 20°C y con luz artificial en épocas desfavorables. Han sido las siguientes:

Chenopodiaceas: *Chenopodium amaranticolor*

Chenopodium quinoa

Spinacea oleracea

Crucíferas: *Anthirrhinus majus*

Brassica napus

Brassica oleracea

Cherianthus cheiri

Matthiola annua

Papillionaceas: *Phaseolus vulgaris*

Vicia faba, var. "Aguadulce"

Solanaceas: *Lycopersicum sculentum*

Nicotiana clavelandi

Nicotiana glutinosa

Nicotiana tabacum var. "White Burley"

Petunia hybrida

Umbelíferas: *Apium graveolens*

Para ensayos de infectividad, hemos empleado plantas que producen lesiones locales al ser inoculadas por los distintos virus objeto de nuestro trabajo, lo cual nos puede dar una idea cuantitativa de la infección por recuento de las lesiones. Las plantas utilizadas han sido:

Chenopodium amaranticolor

Chenopodium quinoa

2. OBTENCION DE PROTOPLASTOS

En todas las experiencias hemos obtenido los protoplastos por métodos enzimáticos, realizando la digestión del material intercelular y la pared celular conjuntamente, mediante una solución de pectinasa y celulasa.

Como paso previo al tratamiento enzimático hay que esterilizar las hojas y desprender su epidermis inferior para facilitar la penetración y actuación de las enzimas. Los métodos que hemos utilizado para obtener protoplastos de diferentes especies vegetales son los que se detallan a continuación

2.1. Método de Davey (1973)

Incluye una preplasmolisis anterior a la digestión enzimática y ha sido empleado en la obtención de protoplastos de *Vicia faba* var. "Aguadulce", introduciendo algunas modificaciones como sustituir la celulasa por "drieselasa" e incrementar ligeramente la temperatura. Los pasos a seguir son los siguientes:

- Esterilización de las hojas por inmersión en etanol al 70% durante un minuto e hipoclorito sódico al 2% treinta minutos.

- Lavados sucesivos en agua destilada esteril
- Eliminación de la epidermis inferior con pinzas y cortar las hojas ya peladas en trozos de 1 ó 2 cm²
- Preplasmolisis en sacarosa esteril al 25% durante una hora a temperatura ambiente.
- Digestión enzimática, incubando los protoplastos a 25°C durante 20 horas en una solución esteril de:
 - pectinasa al 5%
 - celulasa al 5% pH = 5,8
 - sacarosa al 25%
- Centrifugación a 270g durante 5 minutos y lavados sucesivos con sacarosa esteril al 25%.

2.2. Metodo de Prat y Poirier-Hamon (1975)

Se caracteriza por el alto rendimiento de protoplastos intactos obtenidos en un escaso periodo de tiempo (2,5 horas). Hemos obtenido protoplastos de *Matthiola annua* (alhelí) mediante el siguiente proceso:

- Esterilización de las hojas introduciéndolas en dodecilsulfato sódico(SDS) al 0,1% en agitación durante 2,5 minutos, y en cloramina T al 0,5% diez minutos.

- Cinco lavados de las hojas en agua destilada esteril.
- Desprender la epidermis inferior y cortar las hojas en trozos de 1 ó 2 cm²
- Digestión enzimática durante 2,5 horas a 32°C en reposo, con una solución de:
 - drieselasa al 0,27%
 - pectinasa al 5 % pH = 5,3
 - manitol 0,7 M
- Centrifugación a 100g 2 minutos y resuspender tres veces en manitol 0,7 M y sacarosa al 2% para lavar los protoplastos obtenidos.

2.3. Método de Chupeau y colaboradores (1974)

Consiste en el ataque enzimético de las células de mesófilo por una solución muy diluida de dos celulasas y una pectinasa que actúan lentamente y de forma continuada.

Este método es el que nos ha dado mejores resultados con hojas de *Nicotiana tabaccum* var. "White Burley", así como con *Vicia faba* y *Matthiola annua*. Las etapas a seguir son las siguientes:

- Lavado de las hojas en dodecilsulfato sódico al 1% durante tres minutos, agitando constantemente con una espátula.

- Esterilización de las hojas, sumergiendolas en una solución de cloramina T al 1 %

- Lavados sucesivos en agua destilada esteril

- Desprender la epidermis inferior con la ayuda de pinzas y cortar las hojas, ya peladas, en trozos de unos 2 cm²

- Digestión enzimática, colocando el mesófilo de las hojas sin epidermis sobre una solución enzimática que contiene:

macerozima R-10	0,02	
celulasa Onozuka	0,10 %	
drieselasa	0,05 %	pH = 5,7
manitol	0,7 M	

Se mantiene durante toda la noche (14 - 16 horas) a 25°C en placas de Petri y en reposo.

- Agitación suave de las placas inmediatamente antes de centrifugar, con el fin de desprender los protoplas_utos que puedan quedar adheridos entra sí o a la epidermis su_uperior de la hoja.

- Centrifugación a 100g durante un minuto para sedimentar los protoplastos

- Resuspender tres veces en manitol 0,7 M y cloruro cálcico 0,1 mM para lavar los protoplastos obtenidos

2.4. Recuento de protoplastos

Para determinar el rendimiento de los protoplastos intactos obtenidos, hemos procedido al recuento de los mismos en una "Cámara de Thoma" mod. 96 BRAND, calculando el número de protoplastos obtenidos a partir de una cantidad determinada de hojas frescas.

3. CULTIVO DE PROTOPLASTOS

Los protoplastos aislados han sido incubados en diversos medios de cultivo donde se han mantenido intactos durante varios días y han llegado a dividirse. Los medios de cultivo utilizados han sido:

a) Medio B-5 (Gamborg, 1968): formado por un conjunto de macronutrientes y micronutrientes junto con vitaminas y otros compuestos orgánicos.

b) Medio de Prat y Poirier-Hamon (1975): posee

auxinas que estimulan la división celular haciendo aparecer embrioides a los pocos días.

c) Medio de Aoki y Takebe (1969): posee únicamente nutrientes celulares esenciales gracias a los cuales, los protoplastos se mantienen inalterados durante varios días sin llegar a dividirse.

La composición de estos medios de cultivo se indica a continuación.

TABLA III - MEDIO B-5

Componentes	mg/l	Componentes	cant./l
$\text{PO}_4\text{H}_2\text{Na}$	150	$\text{SO}_4\text{Mn} \cdot \text{H}_2\text{O}$	10 mg
NO_3K	3000	BO_3H_3	3 mg
$\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$	134	$\text{SO}_4\text{Zn} \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$	2 mg
$\text{SO}_4\text{Mg} \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$	500	$\text{MoO}_4\text{Na}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$	250 ug
$\text{Cl}_2\text{Ca} \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$	150	SO_4Cu	25 ug
Fe-Secuestreno 330	28	$\text{Cl}_2\text{Co} \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$	25 ug
Ac. nicotínico	1	IK	750 ug
Tiamina - ClH	10	Sacarosa	20 g.
Piridoxina - ClH	1	2,4-D	2 mg
m-Inositol	100	pH = 5,5	

TABLA IV - MEDIO DE PRAT Y POIRIER-HAMON

Componentes	mg/l	Componentes	mg/l
NO_3K	2000	m-Inositol	5000
ClK	1500	Caseina	400
$\text{Cl}_2\text{Ca} \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$	1300	Ac. nicotínico	5
NO_3NH_4	800	Piridoxina ClH	0,5
$\text{SO}_4\text{Mg} \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$	400	Tiamina ClH	0,5
$\text{PO}_4\text{H}_2\text{K}$	200	Ac. fólico	0,5
$\text{SO}_4\text{Mn} \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$	50	Biotina	0,5
BO_3H_3	20	6-Benciladenina	0,5
$\text{SO}_4\text{Zn} \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$	20	2,4-D	0,9
$\text{MoO}_4\text{Na}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$	0,5	D-manitol	0,7 M
$\text{SO}_4\text{Fe} \cdot \text{H}_2\text{O}$	5	Sacarosa	0,06 M
pH = 5,7			

TABLA V - MEDIO DE AOKI Y TAKEBE

Componentes	Molaridad	Componentes	ug/ml
$\text{PO}_4\text{H}_2\text{K}$	0,2 mM	6-Benciladenina	1
NO_3K	1 mM	2,4-D	1
SO_4Mg	1 mM	Cefaliridina	300
Cl_2Ca	10 mM	Rimocidina	10
IK	1 uM	pH = 5,4	
SO_4Cu	0,01uM		

El cultivo de protoplastos ha sido realizado siempre en medio líquido, según dos modalidades:

- En reposo a 25 - 30°C con iluminación constante de luz fluorescente blanca (2500 lux)
- En agitación suave, incubando a 25°C con iluminación constante de 2500 lux, tras mantenerlos toda la noche en la oscuridad.

Dado que los procesos de obtención y cultivo de protoplastos no se han llevado a cabo en condiciones totalmente estériles, a todos los medios de cultivo les

hemos añadido Cefaloridina (300 ug/ml) y Fungizona (200 ug/ml) para evitar contaminaciones bacterianas y fúngicas respectivamente.

4. INFECCION DE PROTOPLASTOS POR VIRUS

La infección de protoplastos por un purificado de virus, ha sido realizada siguiendo las directrices de Otsuki y Takebe (1973-1976), así como de Shalla y Petersen (1973), con algunas modificaciones. De este modo, hemos logrado infectar protoplastos de diversas especies vegetales con los virus del mosaico del nabo (TuMV) y del mosaico amarillo de la judía (BYMV), ambos pertenecientes al grupo de los Potyvirus, así como con el virus de simetría icosaédrica, no caracterizado.

El procedimiento de infección de protoplastos ha sido muy similar al inocular con los virus de tipo Y que con el virus esférico, puesto que las diferencias se han debido a la concentración de los inóculos, al pH, y a los tiempos de preincubación e incubación, siendo más elevados en el caso de los Potyvirus.

La inoculación de protoplastos de células del parénquima comprende los siguientes pasos:

1º) Aislamiento de protoplastos; por cualquiera de los métodos anteriormente descritos, conservándolos en manitol 0,7 M a una concentración de 10^6 células/ml

2º) Preincubación del virus con poliornitina; diluyendo un purificado de virus (que servirá de inóculo) en tampón citrato o borato, según el virus, hasta una concentración de 5 - 25 ug de virus/ml, conteniendo D-manitol 0,7 M y poliornitina (PM = 130000, Pilot Chemical) a 3 ug/ml. Esta preincubación se lleva a cabo en un baño de agua a 25°C durante 10 ó 20 minutos, con agitación ocasional suave.

3º) Inoculación de protoplastos; la solución de virus/poliornitina se mezcla con un volumen igual de protoplastos frescos (recién resuspendidos en manitol 0,7 M) y se mantienen 15 ó 30 minutos en un baño de agua a 25°C agitando suavemente de forma ocasional.

4º) Lavado de protoplastos; por centrifugación a 100g un minuto, resuspendiendo tres veces en manitol 0,7M y cloruro cálcico 0,1 mM para eliminar el exceso de virus que no ha sido absorbido por los protoplastos.

5º) Incubación de los protoplastos inoculados; en el medio de Aoki y Takebe (1969) a una concentración de

1 - $3 \cdot 10^5$ protoplastos/ml con iluminación constante de luz fluorescente blanca (2000lux) a una temperatura de 28°C

Las condiciones de la infección han sido diferentes según el virus utilizado como inóculo, quedando resumidas en la siguiente Tabla.

TABLA - VI

CONDICIONES OPTIMAS EN QUE SE REALIZO LA INFECCION DE PROTOPLASTOS POR DIFERENTES VIRUS VEGETALES			
1.- PREINCUBACION	TuMV	BYMV	ESFERICO
Concentración del virus	30 ug/ml	25 ug/ml	6 ug/ml
Concentración de PLO	6 ug/ml	6 ug/ml	3 ug/ml
Tampón citrato	---	0,02 M	0,02 M
Tampón borato	0,05 M	---	---
pH	8,2	5,8	5,0
Tiempo en minutos	20	20	10
2.- INOCULACION	TuMV	BYMV	ESFERICO
Concentración del virus	15 ug/ml	12,5 ug/ml	3 ug/ml
Concentración de PLO	3 ug/ml	3 ug/ml	1,5 ug/ml
Protoplastos/ml	$5 \cdot 10^5$	$5 \cdot 10^5$	$5 \cdot 10^5$
Tiempo en minutos	30	20	15

5. ENSAYOS DE INFECTIVIDAD

Como prueba de que la infección de los protoplastos ha tenido lugar, hemos realizado ensayos de infectividad sobre plantas testigo utilizando como inóculo un extracto de los protoplastos infectados.

Se tomaron porciones alícuotas de 5 ml del medio de incubación, conteniendo protoplastos inoculados, a distintos tiempos para ser sometidas a centrifugación (100g 1 minuto); Los sedimentos se dispersan en 3 ml de tampón fosfato 0,1 M pH = 7 y se congelan antes de ser inoculados sobre plantas de ensayo.

Una vez descongelados, los protoplastos fueron rotos violentamente por ultrasonidos durante dos minutos, utilizando un Sonicador M S E - 150w Mk2. El homogeneizado resultante se utilizó como inóculo sobre hojas de *Chenopodium amaranticolor* y *Chenopodium quinoa*, que produjeron lesiones locales a los 8 - 10 días.

6. METODOS DE INOCULACION DE VIRUS

La transmisión de virus a diferentes plantas de ensayo, en todos los casos, se ha realizado de forma mecánica, empleando carborundo (400 mesh) como abrasivo y lavando a continuación las hojas con un poco de agua.

Como fuente de inóculo, generalmente, se ha utilizado savia bruta y a veces, suspensiones de virus purificado. La savia ha sido obtenida por trituración de hojas o tallos de plantas enfermas y diluida, en ocasiones, con tampón fosfato 0,01 M pH=7 para evitar posibles pérdidas de infectividad por variaciones del pH.

El número de plantas inoculadas de cada especie, ha sido de seis a ocho, más una o dos como testigo.

Cuando ha sido posible, las inoculaciones se han realizado sobre plantas de ensayo jóvenes (de 15 a 30 días), evitando siempre el periodo crítico de crecimiento donde el daño por inoculación puede causar la muerte de la planta.

Los síntomas empiezan a aparecer a las 2 ó 5 semanas de la inoculación, pudiendo estar influenciados por las condiciones de luz y temperatura durante las distintas estaciones del año.

7. MÉTODOS DE PURIFICACION DE VIRUS

La obtención de suspensiones de virus purificados nos ha servido tanto para realizar una serie de determinaciones físico-químicas (forma, tamaño estructura, propiedades...etc) como para inocular protoplastos sanos de diferentes especies.

Los métodos de purificación empleados han sido los que incluyen el uso de disolventes químicos como cloroforno o tetracloruro de carbono, o bien la precipitación con polietilén-glicol 6000(PEG-6000).

Para la purificación se recolectan hojas de plantas que, llevando de diez a veinte días inoculadas, presentan síntomas evidentes; se pesan y se mantienen unas 24-48 horas en congelador para facilitar la trituration y eliminar una serie de compuestos, normales en la planta, que se insolubilizan al congelar.

Las hojas, una vez pesadas y congeladas, se trituran en presencia de un tampón adecuado, obteniendo savia que es sometida a una desproteínización con solventes orgánicos y a una serie de centrifugaciones diferenciales para eliminar todos los contaminantes.

7.1. Método de Moghal y Francki (1976)

Este método ha sido utilizado para el aislamiento de los dos virus del grupo Y de la patata (TuMV y BYMV), en sus dos versiones:

- a) Precipitando con polietilenglicol-6000
- b) Añadiendo triton X - 100

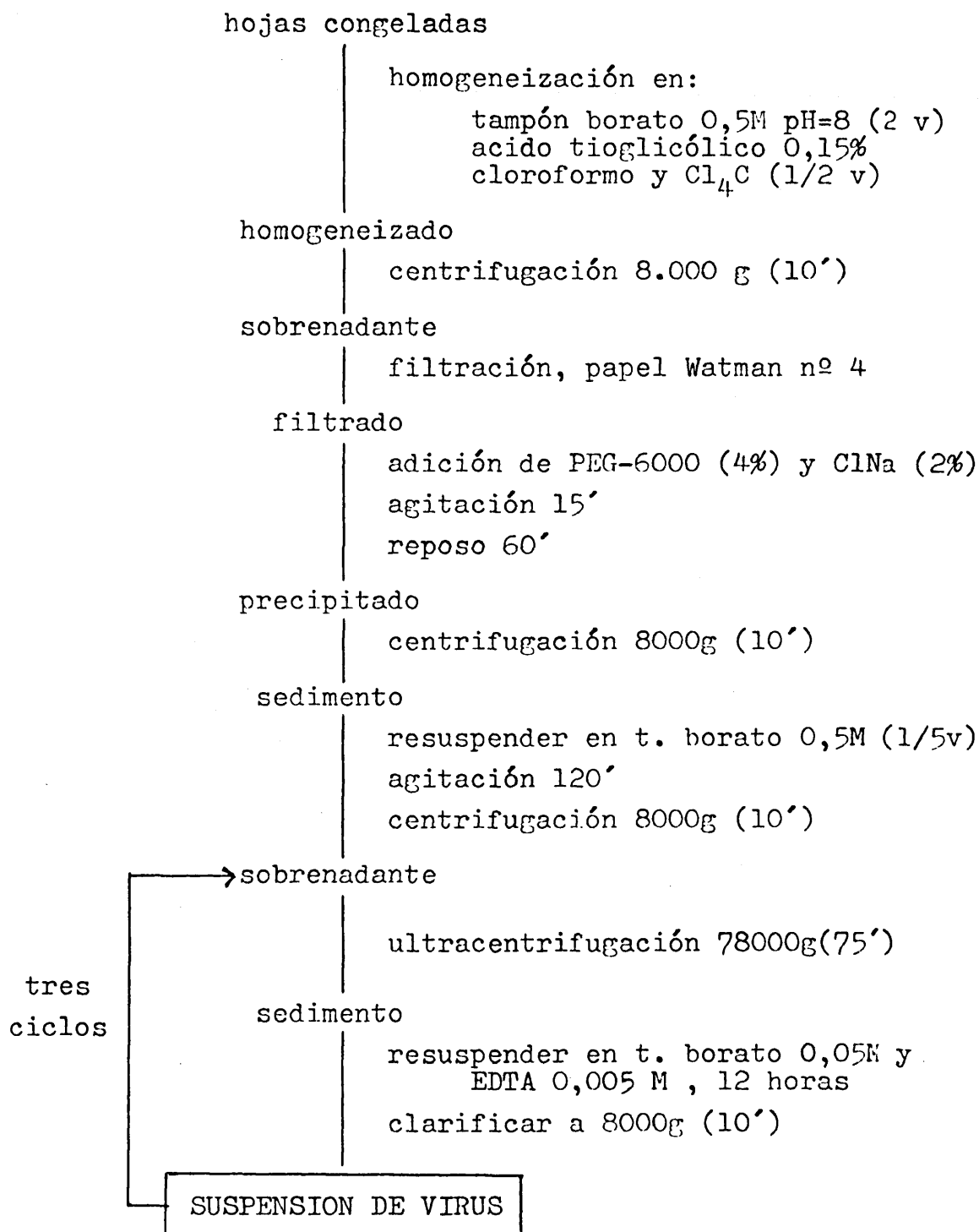
Realiza una homogeneización con tampón borato 0,5 M pH=8 para evitar la agregación de estos virus pues, como es sabido, los virus del tipo Y presentan problemas al purificarlos por su tendencia a formar agregados.

a) Precipitación con Polietilenglicol. Las hojas pesadas y congeladas, se homogeneizan con dos volúmenes (W/V) de tampón borato 0,5 M pH=8, añadiendo 0,15% de ácido tioglicólico como antioxidante y medio volumen (W/V) de cloroformo y tetracloruro de carbono.

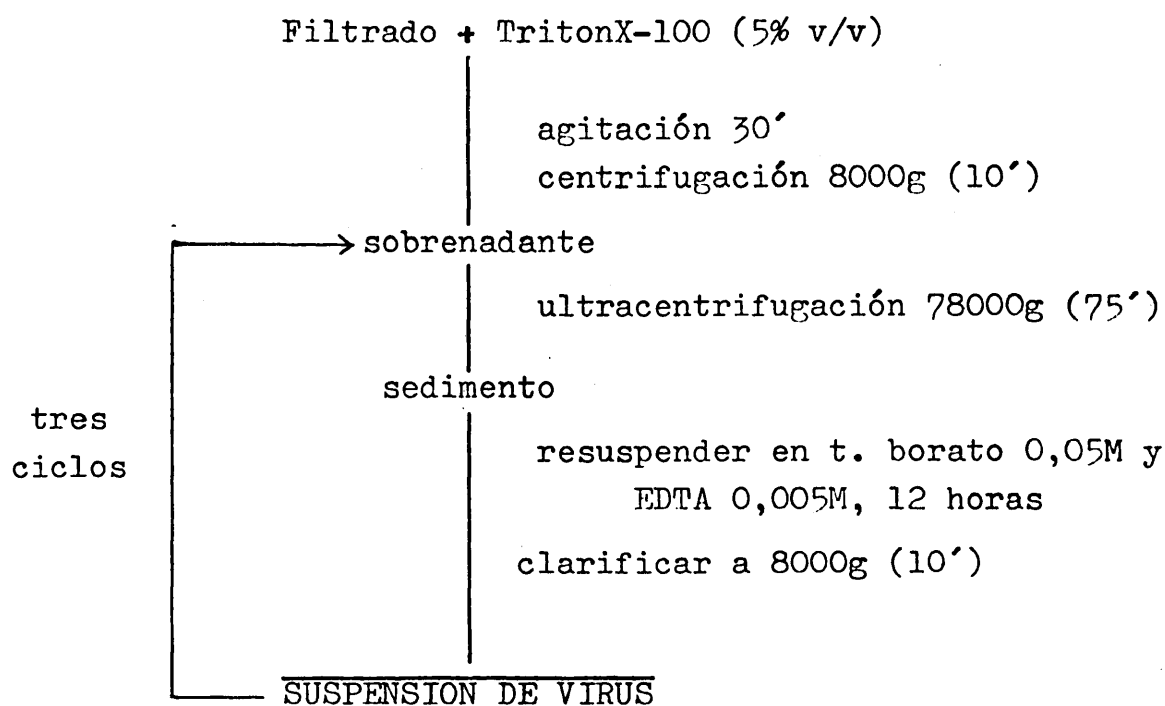
Seguidamente, se filtra el homogeneizado a través de varias capas de gasa y la savia obtenida se somete a una serie de centrifugaciones diferenciales hasta aislar el virus.

El esquema del método utilizado se describe a continuación, teniendo presente que todo el proceso ha de

realizarse a una temperatura entre 0 - 4°C:



b) Adición de Triton X - 100. Para el aislamiento del virus del mosaico del nabo (TuMV), hemos utilizado el mismo método anterior con la particularidad de que en lugar de PEG, se añade Triton X-100 al filtrado de savia:



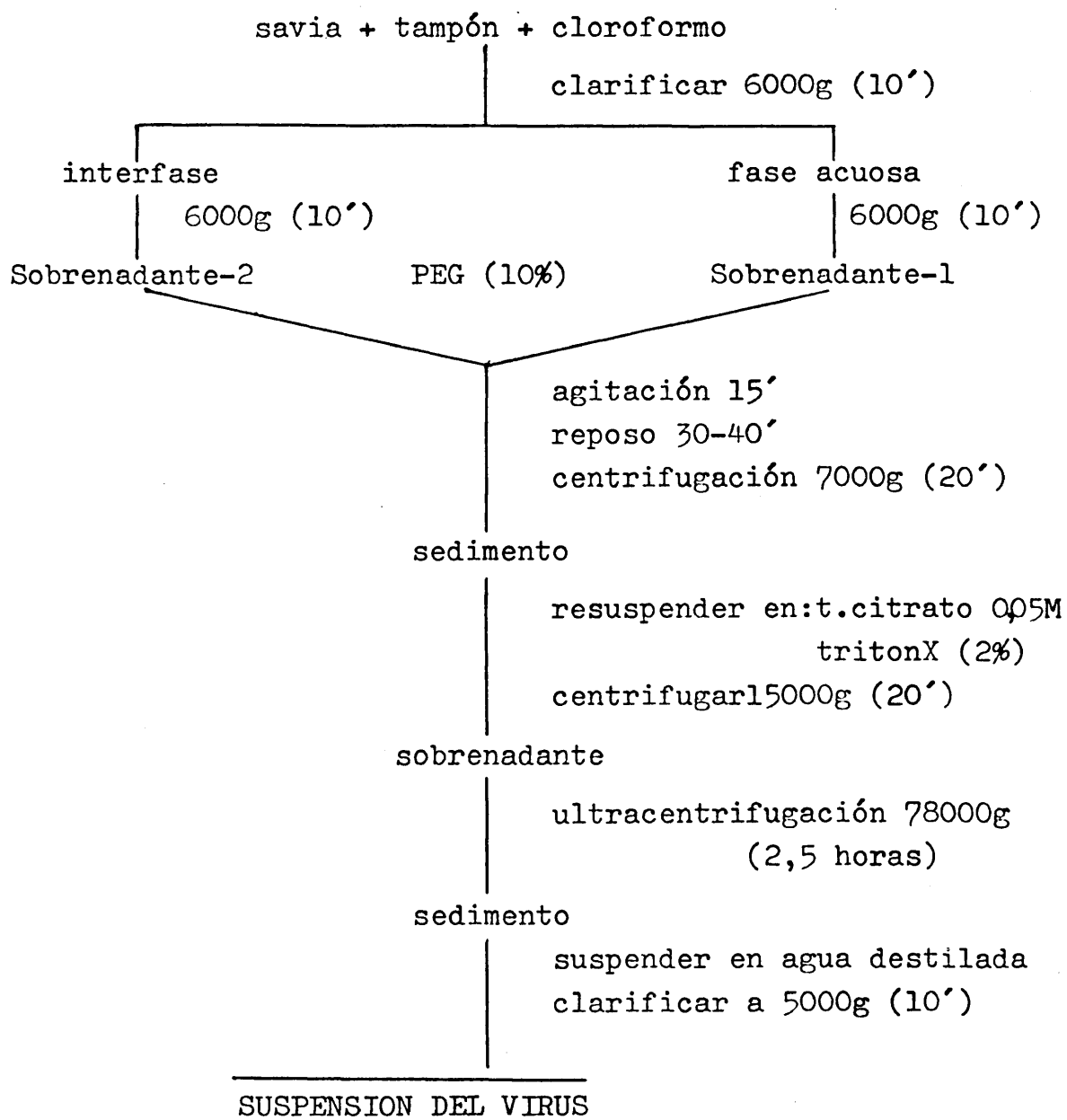
7.2. Método de Lot (1972)

Emplea cloroformo y polietilenglicol-6000, habiendo sido utilizado en la purificación del virus esférico.

Las hojas, una vez pesadas y congeladas, se homogeneizan en presencia de tampón citrato 0,5 M pH=6,5 y cloroformo (2 ml de cada uno/g de hojas) para desproteínizar y

eliminar la clorofila y otros posibles contaminantes. Se aña de también un 0,1% de ácido tioglicólico (antioxidante).

Todo el proceso debe realizarse en frío (4°C) y su esquema es el siguiente:



8. DETERMINACIONES ESPECTROFOTOMETRICAS

Segun Brakke (1967), un espectro de absorción con luz ultravioleta puede servir como prueba de la pureza que posee una preparación de virus, si presenta el aspecto típico de nucleoproteínas, esto es, un mínimo a 240 nm seguido de un máximo a 260 nm. Así mismo, las medidas de la absorción con luz ultravioleta, en soluciones de virus purificado, son indicativas de la concentración y composición cuantitativa de las mismas (Schuster, 1964; Donbrow, 1967).

Hemos determinado los espectros de absorción con luz ultravioleta, de todos los virus purificados, entre longitudes de onda de 230 a 300 nm, en un espectrofotómetro Unicam mod. SP-500. Se ha utilizado como blanco, el propio tampón en que se hallaba diluido el virus y a veces agua destilada. En todas las purificaciones se han calculado los valores de E_{\max}/E_{\min} , E_{260}/E_{280} así como la concentración del virus y el rendimiento alcanzado.

Para la realización de los espectros de absorción de geles de poliacrilamida, hemos utilizado un espectrofotómetro "Gilford" mod. 250 ajustado a una velocidad de 2 pulgadas/minuto para el registro y 2 cm/min para el gel.

9. ELECTROFORESIS EN GEL DE POLIACRILAMIDA

Actualmente, son muy utilizados los geles compuestos por poliacrilamida. La acrilamida presenta ventajas sobre otras sustancias por ser un producto orgánico simple, y comercialmente se puede obtener lo suficientemente pura para ser empleada directamente; esta relativa pureza es una ventaja sobre otras sustancias como agar, agarosa o almidón hidrolizado que, por ser de origen biológico, suelen estar contaminadas.

El gel tiene la posibilidad de cribar ciertas sustancias de elevado peso molecular, aunque tengan idéntica movilidad en solución libre; así, la red del gel impone una resistencia de fricción al paso de moléculas de diferentes tamaños que serán retrasadas según sus dimensiones. La alta resolución de la técnica de geles de poliacrilamida depende de la posibilidad de preparar geles con poros de diferentes tamaños, lo que se puede hacer simplemente ajustando la concentración del monómero de acrilamida antes de polimerizarlo.

La formación del gel ocurre en presencia de pequeñas cantidades de un formador de redes o "cross-linker", la NN'-metilenbisacrilamida, añadida al monómero de acrilamida. Además, para realizar la polimerización son ne-

necesarios un catalizador, el persulfato amónico, y un iniciador de la polimerización, TEMED (NNN'-tetrametilendiamina).

Todas las experiencias han sido realizadas con un equipo de electroforesis ISCO mod. 1270

9.1. Electroforesis de las proteínas virales

Un paso previo al análisis de proteínas virales en electroforesis consiste en disociarlas, es decir, deshacer los agregados y por tanto, desnaturalizar en parte la proteína para liberarla de sus múltiples uniones a otras moléculas protéicas y al ácido nucleico. La disociación de la proteína del virus debe hacerse con el mínimo de desnaturalización concomitante.

Hemos utilizado el método de Lane (1974) que emplea un detergente (dodecilsulfato sódico) como agente disociador y el tampón de electroforesis de Peacock y Dingman (1967) diez veces concentrado (10 X), cuya composición es la siguiente:

Tris-clorhídrico	108 g	
EDTA disódico	3,7 g	por litro
Acido bórico	55 g	pH=8,3

Partimos de una suspensión de virus purificado y la mezclamos con un volumen igual del tampón disociador de la proteína que contiene:

Sacarosa	5 g
Tampón de electroforesis	7,5 ml
Agua destilada	7,5 ml
Dodecilsulfato sódico al 10%	0,5 ml
Mercaptoetanol	1/30 v

Se incubaba dos minutos en un baño de agua hirviendo con lo cual queda disociada la proteína.

Para realizar la electroforesis de las proteínas virales hemos empleado geles de poliacrilamida (9,5 % de acrilamida) cuya composición química es la siguiente:

NN'-metilén-bisacrilamida	250 mg
Acrilamida	4,75 g
Agua destilada	17 ml
Tampón de electroforesis 10X	10 ml
Urea	24 g
SDS al 10%	0,5 ml
Persulfato amónico al 10%	0,08 ml

La gelificación tiene lugar en un baño de agua a 40°C polimerizando en 15 - 20 minutos (10 ul de TEMED por 25 ml). Sobre la superficie del gel se deposita,

urea 8 M con 1% de dodecilsulfato sódico (SDS) y tampón de electroforesis 2X.

Se llenan los recipientes para la electroforesis con tampón 2X, la cuba superior contiene además un 0,1 % de SDS.

Partimos de un purificado de virus que diluimos hasta una concentración de 0,5 mg/ml con tampón de electroforesis y se mezcla con un volumen igual del tampón disociador de la proteína. Las muestras (unos 10 μ l) se someten a lelctroforesis durante 5 horas a temperatura ambiente, aplicando un potencial constante de 100 voltios.

Una vez concluida la electroforesis, los geles se tiñen en una solución de azul brillante de cumasina al 2% que contiene 9 volúmenes de ácido acético, 45,5 de metanol y 45,5 de agua destilada.

Se destiñen por difusión en una solución con 70 ml de ácido acético y 250 ml de metanol, diluida con agua destilada hasta un litro.

9.2. Electroforesis de los ácidos nucleicos virales

El procedimiento empleado en la electroforesis de ácidos nucleicos es similar al de las proteínas, incluso utiliza el mismo tampón de electroforesis (Lane, 1974). La composición del gel de poliacrilamida (2,9 % de acrilamida) es la siguiente:

NN'-metilén-bisacrilamida	144 mg
Acrilamida	2,76 g
Agua destilada	85 ml
Tampón de electroforesis 10X ..	10 ml
Sacarosa	3 g
SDS al 10 %	1 ml
Persulfato amónico al 10 %	1 ml

Por cada 25 ml de la solución del gel se añaden 40 ul de TEMED y polimeriza a los 4 minutos. Sobre el gel se deposita una solución conteniendo el tampón de electroforesis más SDS en un 0,05 %.

Para realizar la electroforesis del RNA viral, hay que llevar a cabo la disociación del virus en sus componentes (proteína y RNA), para lo cual utilizamos el siguiente tampón disociador:

Tampón 10X	5 ml	
SDS al 10 %	10 ml	
Urea 10 M	7,5 ml	Se conserva a -20°C
Mercaptoetanol	0,5 ml	
Sacarosa	4,5 g	

Antes de la electroforesis, las muestras de virus se diluyen con el tampón de electroforesis, calculándose que contengan de 100 a 500 ug de RNA/ml. Las muestras se mezclaron con 1/4 - 1/2 de volumen del tampón disociador, e inmediatamente antes de la electroforesis se calientan durante 5 minutos a 50°C.

Se llenan las cubas de electroforesis con tampón 1X y la superior contendrá además un 0,05 % de SDS. Las muestras son depositadas sobre la superficie del gel, debiendo contener unos 5 ug de RNA en 50 ul de solución.

El potencial ha sido ajustado a 100 voltios y la electroforesis se realiza a temperatura ambiente durante 3,5 horas, aproximadamente.

Terminado el proceso, los geles se tiñen una hora en azul de toluidina al 0,1% conteniendo metanol al 50% y ácido acético al 0,5 %. Se destiñen durante toda la noche en metanol del 40% y ácido acético al 1 %, seguido de varias horas en ácido acético al 10 %.

9.3. Determinación de pesos moleculares por electroforesis

El cálculo de pesos moleculares a partir de una electroforesis, donde corren muestras de peso molecular conocido junto con un virus, RNA o proteínas, está basado en la existencia de una relación de proporcionalidad directa entre el peso molecular de estas sustancias y su movilidad electroforética al atravesar un gel en presencia de un campo eléctrico (Boedtker, 1971).

Se realiza una representación gráfica de movilidades frente a pesos moleculares (en escala semilogarítmica) de las muestras conocidas y, tras ajustar la recta, podemos deducir el peso molecular que corresponde a una movilidad electroforética dada.

A veces, en lugar de movilidades pueden medirse las distancias recorridas por las diferentes sustancias al atravesar el gel.

Los pesos moleculares de las proteínas virales calculados por nosotros, han sido determinados utilizando como muestras control:

- | | |
|-------------------------------|-----------------------|
| - Aldolasa (147000) | - Mioglobina (17800) |
| - Seroalbúmina bovina (67000) | - Citocromo-C (12400) |
| - Quimotripsinógeno A (25000) | |

10. MICROSCOPIA ELECTRONICA

Hemos empleado los métodos de "tinción negativa" para el estudio de los virus aislados mediante purificación y en savia de plantas. Las técnicas de "cortes ultrafinos" han sido utilizadas para estudiar la ultraestructura de células infectadas, la localización de las partículas de virus y su posible interacción con los orgánulos celulares, tanto si se trata de células aisladas (protoplastos) como si están formando parte de un tejido.

10.1. Técnicas de tinción negativa

Se han empleado para la observación directa de savia (permite realizar controles periódicos de las plantas de ensayo) o en purificaciones de virus, en cuyo caso podemos determinar el tamaño, concentración y estructura de las partículas.

Todos los métodos utilizados (Hall, 1955; Huxley, 1956) tienen en esencia el mismo fundamento que consiste en lograr colocar sobre un soporte el objeto a teñir, junto con una solución de algún metal pesado (tungsteno o uranilo). Dichos metales forman una película alrededor del objeto impidiendo el paso de los electrones, con lo cual se

obtiene una imagen negativa del mismo.

Nosotros, hemos utilizado una solución de ácido fosfotungstico (P.T.A.) al 2% en agua destilada, llevada a pH=7 con hidróxido potásico, que se mezcla con una suspensión de virus purificado a partes iguales (Brenner y Horne, 1959). En ocasiones, hemos empleado acetato de uranilo obteniendo una tinción positiva de los virus.

En el caso de preparaciones a partir de savia mezclamos una gota de la solución de ácido fosfotungstico con otra gota de savia obtenida por presión de la hoja o por corte de la misma (Brandes, 1957).

En cualquier caso, una gota de la mezcla se deposita sobre una rejilla soporte con una película de formvar y otra de carbón vaporizado; se deja un minuto y se retira el exceso de líquido con una piteta Pasteur estirada, dejando secar para observar la preparación al microscopio electrónico.

A veces, se realiza una fijación previa del virus, mezclándolo con una solución de formaldehído al 2% (Kelley y Kaesberg, 1962; Gibbs y col. 1963) para evitar la ruptura de las partículas por al P.T.A. (Hull y col. 1969).

Para determinar el tamaño de las partículas virales en tinción negativa, hemos calculado la media aritmética del diámetro del virus esférico medido sobre fotografías (Hitchborn y Hill, 1965). Para los virus de tipo Y hemos medido las partículas, observando que presentan distintos tamaños y existe una "longitud principal" fácilmente destacable mediante histogramas (Bode y Köhler, 1952 ; Brandes y Wetter, 1959).

10.2. Técnicas de cortes ultrafinos

Nos ha permitido estudiar la ultraestructura de los protoplastos y plantas de ensayo inoculadas, después de comprobar su infección por sintomatología y los métodos de tinción negativa descritos anteriormente.

Este método utiliza pequeños trozos de tejido (1-2 mm²) de zonas de la hoja donde los síntomas de la enfermedad son más patentes. Estos trocitos (piezas) se someten a una serie de pases por distintas sustancias, siguiendo un proceso que consta de las siguientes fases:

- a) Fijación en una solución de tetróxido de osmio
- b) Deshidratación en una serie de acetonas
- c) Inclusión en una resina "epoxy" (Araldita)

a) Fijación.— Suele realizarse una prefijación con glutaraldehído al 5% (Sabatini y col. 1963) en tampón Veronal pH=6,9. Trás permanecer 45 minutos a 4°C se procede a lavar las piezas con el tampón 4 ó 5 veces (cada 10 minutos). A continuación se realiza la fijación propiamente dicha en una solución de tetróxido de osmio (Palade, 1952).

La solución fijadora "Palade" se prepara en el momento de usarla, mezclando a partes iguales una solución de tetróxido de osmio al 2% con una "solución tampón Veronal". Estas dos soluciones madres, se pueden conservar en frío durante largo tiempo. La "solución tampón veronal" esta formada por:

Solución A: Veronal sódico	14,7 g
Acetato sódico	9,7 g
Agua destilada	500 ml

Solución B: Acido clorhídrico 0,1 M

Solución C: Agua destilada

y se prepara mezclando estas tres soluciones en la proporción de 2 : 2 : 1 respectivamente.

b) Deshidratación.— El material se deshidrata en una serie de acetonas de concentración creciente que va desde el 30% hasta el 100% (Ryter y Kellenberger, 1958). El contraste, en la fase de deshidratación, se obtiene con una solución de acetato de uranilo al 2% en acetona de 70%.

c) Inclusión.— Las piezas se incluyen en una resina epoxy "Araldita" (Glauert y Clauert, 1958). Como sustancia "puente" entre la acetona y la araldita se emplea óxido de propileno (Luft, 1961). El proceso de la inclusión se realiza utilizando dos mezclas de araldita, cuyas composiciones son las siguientes:

Mezcla Araldita I

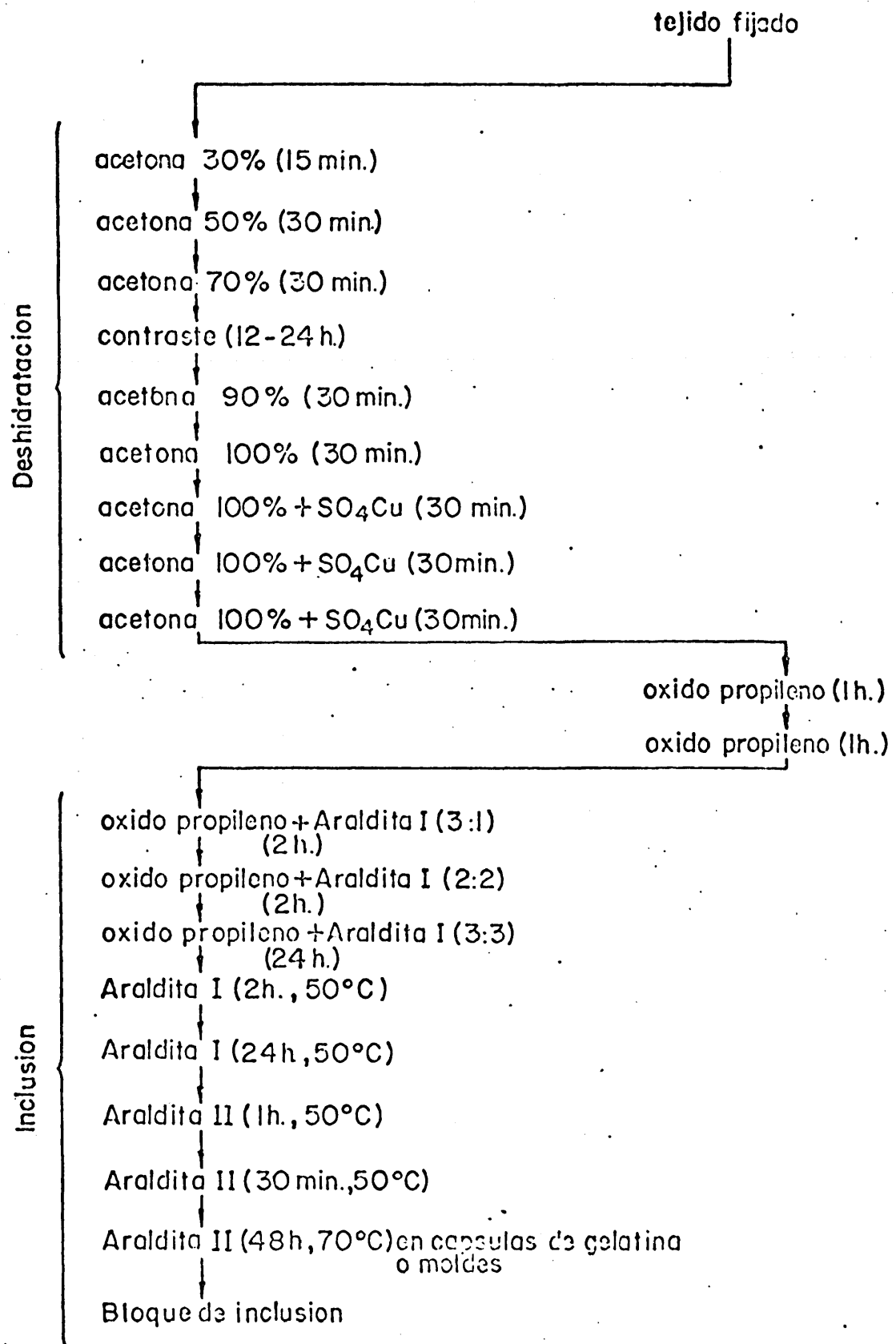
Resina epoxy araldita	49%
Anhídrido dodecil succínico (endurecedor 964) ...	49%
Ftalato de butilo (plastificador 964)	2%

Mezcla Araldita II

Se obtiene añadiendo tridimetilamino-fenol (acelerador 964) en un 3-4 % a la Mezcla Araldita I

estas mezclas se preparan 20 minutos antes de su empleo conservandolas a 50°C para obtener una homogeneidad adecuada.

A continuación esquematizamos todo el proceso:



10.2.1. Cortes ultrafinos de protoplastos

En el caso particular de la preparación de protoplastos para ser observados al microscopio electrónico, hemos realizado algunas modificaciones que afectan primordialmente a la "fijación", como son, trabajar con pequeños trozos de agar conteniendo protoplastos (Gigot y col. 1972), o bien fijar los protoplastos en suspensión (Cocking y Pojnar, 1969; Willison y Cocking, 1972). El proceso seguido ha sido el siguiente:

Fijación: se realiza mezclando a partes iguales una suspensión de protoplastos con una solución fijadora que contiene:

glutaraldehído	12 %
cloruro cálcico	1 %
cloruro magnésico	1 %
tampón Millonig (1/10)	pH=6,1
manitol	0,7 M

Esta solución se añade gota a gota agitando constantemente y manteniéndola a 4°C durante 45-60 minutos.

Lavados: en tampón Millonig (1961) diluido diez veces (1/10), conteniendo manitol 0,7 M y cloruros cálcico y magnésico al 1 %. Para realizar estos lavados de protoplastos, hay que centrifugar a 100g 1 ó 2 minutos hasta

sedimentarlos, resuspendiéndolos tres veces en el citado tampón.

Postfijación: en una solución de tetróxido de osmio al 2 %, en agua destilada, conteniendo manitol 0,7 M que se mezcla con un volumen igual de una suspensión de protoplastos ya lavados. (Otsuki y col. 1972).

Esta fijación se lleva a cabo durante 1,5 ó 2 horas, agitando cada 10 minutos para impedir que los protoplastos sedimenten y su fijación resulte defectuosa.

Inclusión en agar: a un sedimento de protoplastos fijados (100g 2') se añaden varias gotas de agar al 3% (mantenido líquido a 45-50°C), agitando suavemente con un punzón para que el agar envuelva a los protoplastos.

Cuando el agar solidifica por enfriamiento, se somete a deshidratación, fraccionamiento en trozos pequeños (1-2 mm³) y posterior inclusión en Araldita, siguiendo el mismo proceso que las piezas de tejido (Kubo y col. 1976).

En ocasiones, hemos trabajado desde un principio con pequeños cubos de agar que contienen protoplastos, realizando todos los pasos posteriores como si se tratara de trozos de hojas (Gigot y col. 1975).

10.3. Obtención de cortes ultrafinos

Los cortes se han obtenido con un ultramicrotomo sobre una solución alcohólica al 10 %, utilizando cuchillas de vidrio fabricadas por nosotros. La recogida de estos cortes se realiza por una modificación de la técnica de Gettner y Hillier (1950), empleando una rejilla con película de formvar que por contacto queda con los cortes adheridos, una vez que éstos han sido estirados con vapores de cloroformo.

Hemos realizado cortes de un grosor que oscila entre 400 y 600 Å, utilizando un ultramicrotomo Reichert y un piramitóm L.K.B.- 11800.

10.4. Tinción de cortes ultrafinos

Además del contraste que se le dá a la pieza (con el acetato de uranilo) en la fase de deshidratación, los cortes son teñidos con una solución de citrato de plomo, siguiendo la técnica de Watson (1958), modificada por Reynolds (1963).

Consiste en colocar la rejilla con los cortes

sobre pequeñas gotas filtradas de una solución de citrato de plomo (15 minutos) y lavar después abundantemente con agua destilada. La solución de tinción debe estar totalmente exenta de carbonatos, para evitar la formación de carbonato de plomo que precipita sobre los cortes impidiendo la visibilidad de los elementos celulares.

Las observaciones microscópicas se han llevado a cabo en un microscopio electrónico Siemens mod. Elmiskop I, operando a 80 y 100 Kilowatios.

CAPITULO III. RESULTADOS EXPERIMENTALES

1. EXPERIENCIAS REALIZADAS CON PROTOPLASTOS

1.1. Obtención de protoplastos

Empleando los procedimientos descritos en el capítulo de Material y Métodos, hemos aislado protoplastos de diversas plantas superiores utilizando métodos enzimáticos con un tratamiento conjunto de celulasa y pectinasa (Kassanis y White, 1974).

La aplicación de una solución diluida de enzimas durante un tiempo prolongado (Chupeau y col. 1974) nos ha dado muy buenos resultados con todas las especies vegetales con que hemos trabajado, siendo los rendimientos obtenidos los siguientes:

<u>especie vegetal</u>	<u>nº protoplastos /g de hojas</u>
Matthiola annua (alhelí)	5,8 · 10 ⁶
Vicia faba, var. "Aguadulce" (haba)	5,6 · 10 ⁶
Nicotiana tabacum, var. "White Burley" (tabaco) ..	7 · 10 ⁶

El método rápido de Prat y Poirier-Hamon (1975) nos ha permitido alcanzar un resultado favorable con hojas de alhelí (5,2 · 10⁶ protoplastos/g de hoja) en el escaso periodo de tiempo de 2,5 horas.

Protoplastos intactos de habas han sido aislados con éxito por el método de Davey (1973) que emplea una preplasmolisis en sacarosa. Los rendimientos obtenidos de este modo han sido de $3,4 \cdot 10^6$ protoplastos/g de hojas. Esta disminución del rendimiento respecto de Chupeau y col. (1974) se ve compensada por el hecho de que hemos evitado la fusión de protoplastos entre sí, lo cual es especialmente notable en el caso de hojas jóvenes (Withers y Cocking, 1972).

Hemos seguido el curso de los protoplastos aislados por observaciones constantes al microscopio óptico pudiendo apreciar que el protoplasto recién obtenido se presenta totalmente esférico, lo cual indica que ha perdido por completo su pared celular y responde simplemente a la presión osmótica del medio en que se encuentra.

Por observación directa en contraste de fase, pueden verse los cloroplastos de color verde situados en la periferia, junto a la membrana plasmática, así como una gran vacuola central ocupando casi todo el protoplasto (Fig 1).

1.2. Cultivo de protoplastos

Hemos realizado el cultivo de protoplastos en medio líquido, utilizando los medios B-5 (Gamborg, 1968), de Prat y Poirier-Hamon (1975) y de Aoki y Takebe (1969), cuyas composiciones respectivas se indicaron en las Tablas III - IV y V. Los resultados obtenidos con los diferentes medios de cultivo son descritos a continuación:

Medio B-5: hemos podido cultivar protoplastos de *Vicia faba*, var. "Aguadulce", observando que entraban en división a las 30 horas de cultivo.

El tipo de división más frecuente es peculiar pues del protoplasto se separan dos porciones de diferente tamaño, una de ellas es pequeña y muy densa mientras que la porción mayor aparece con escaso citoplasma y una gran vacuola (Fig. 2, A y B).

A veces se dividen por bipartición, formando un tabique que reparte equitativamente el citoplasma entre las dos células hijas (Fig 2, D y E).

También hemos observado la formación de yemas por gemación, originando una estructura de aspecto cenocítico (Fig 2, F).

Cuando se produce la división, el protoplasto ya ha regenerado una nueva pared celular, observable al microscopio de luz, y comprobado porque estas células no son plasmolizadas en ausencia de manitol 0,7 M.

Con escasa frecuencia hemos observado la fusión intraespecífica de protoplastos de habas, durante su aislamiento o cultivo en el medio B-5, pudiendose haber producido protoplastos polinucleados (Fig 2,G).

Medio de Prat y Poirier-Hamon: hemos cultivado protoplastos de *Matthiola annua* en este medio, observándose su primera división a las 20 horas de cultivo.

Los protoplastos se fragmentan de forma irregular, observándose divisiones por bipartición, gemación y ambas a la vez (Fig 3, A B y C).

A los 3 ó 4 días de cultivo, estas divisiones anárquicas han dado lugar a la formación de "embrioides" (Fig 3, D y E).

Hay que hacer notar que la temperatura e iluminación a que se cultivaron estos protoplastos, apenas influye en la velocidad con que se dividen los mismos, pues células cultivadas a 28°C con iluminación constante de 2500 lux, y a 4°C en la oscuridad, han logrado dividirse prácticamente al mismo tiempo.

Medio de Aoki y Takebe: en este medio no hemos observado división alguna de protoplastos con ninguna de las especies cultivadas (*Nicotiana tabacum*, var. "White Burley", *Matthiola annua* y *Vicia faba*, var. "Aguadulce").

Los protoplastos se conservan intactos durante tres o cuatro días, con la particularidad de que su citoplasma aparece gradualmente más denso (Fig 1, D).

1.3. Microscopía electrónica de protoplastos

Hemos logrado observar protoplastos completos al microscopio electrónico mediante la técnica de cortes ultrafinos, con las variaciones introducidas por Otsuki y col.(1972), para ser aplicada a protoplastos.

La membrana plasmática aparece entera y desprovista de restos de pared celular, lo cual nos demuestra que estamos trabajando con protoplastos de células.

1.3.1. Observación de protoplastos sanos

Las imágenes observadas al microscopio óptico se han visto ratificadas por las conseguidas al electrónico, donde se mantiene la disposición periférica de los

cloroplastos que aparecen más o menos unidos entre sí y próximos al plasmalema. El interior del protoplasto aparece ocupado por una gran vacuola. Los núcleos, cloroplastos y demás orgánulos celulares presentan un aspecto normal, quizás algo alterados por el largo proceso a que ha sido sometido el protoplasto hasta su observación (Figs 4 y 5).

Con bastante frecuencia hemos apreciado una gran actividad del protoplasto sano, como lo demuestra el hecho de que sus cloroplastos suelen entrar en división y se comportan como orgánulos autónomos siendo capaces de capturar y englobar a las mitocondrias (Figs 4 B y 5 A).

En protoplastos sanos de *Vicia faba*, var. "Aguadulce" hemos observado un fenómeno curioso, no descrito hasta ahora en la literatura, consistente en que la célula va formando masas de citoplasma, muy densas a los electrones, a partir de su propia materia viva; estas masas derivan del protoplasma próximo a los cloroplastos o a la membrana celular y son expulsadas hacia la vacuola donde aparecen constituidas por una sustancia muy osmíófila, probablemente citoplasma degenerado (Fig 5, B y C).

1.3.2. Observación de protoplastos infectados

La ultraestructura que presentan los protoplastos inoculados e infectados, con los virus que han sido objeto de nuestras investigaciones, fue analizada por microscopía electrónica obteniendo los siguientes resultados:

1º) Protoplastos de Matthiola annua infectados con el virus del mosaico del nabo (TuMV) aparecen totalmente invadidos por distintas inclusiones virales, habiéndose podido observar:

- "Grandes inclusiones densas", formadas por láminas más o menos extensas que se cierran sobre sí mismas originando cilindros huecos. En sección longitudinal se presentan como gruesas barras, no rectas, de longitud apreciable y perfiles muy bien definidos. En ocasiones dejan ver una estriación longitudinal correspondiente a las partículas de virus que se disponen de forma paralela (Fig 7 y 8)
- "Anillos gruesos" de forma circular o elíptica y que corresponden a las anteriores inclusiones al ser cortadas transversalmente. A veces se presentan dos de estos anillos unidos por un trazo recto lo que nos hace suponer que corresponde a la sec-

ción de una lámina, formada por agregados de virus, que se hubiera enrollado por sus dos extremos (Fig 6 y 7 B y C).

- "Inclusiones en forma de remolino o roseta", siguiendo un cierto orden helicoidal. Los remolinos pueden presentar un número variable de brazos que salen de un punto central, siendo este tipo de inclusión el menos frecuente (Fig 6 B y 7).

2º) Protoplastos de Vicia faba, var. "Aguadulce infectados con el virus del mosaico amarillo de la judía han desarrollado las siguientes inclusiones:

- "Formaciones en barra" muy densas y casi rectas distribuidas por todo el citoplasma (Fig 8 y 9).
- "Cristales de proteína" muy densos electrónicamente, que suelen acompañar a las anteriores inclusiones (Fig 8, A y B).
- "Formaciones fibrilares" localizadas entre las barras densas; parecen estar formadas por largas y flexuosas partículas de virus, observándose con escasa frecuencia (Fig 9 A).
- "Túbulos" más o menos largos que aparecen rodeados por masas de citoplasma. Por su tamaño, estos

túbulos pueden ser homologados a las "formaciones en barra" pero su localización no es intracitoplásmica sino perivacuolar e intravacuolar, apareciendo siempre envueltos por un citoplasma muy denso (Fig 9 C y D). Ningún tipo de inclusión semejante a éste ha sido descrito hasta el momento para el virus del mosaico amarillo de la judía.

3º) Protoplastos de Nicotiana tabacum, var.

"White Burley" infectados con el virus de simetría icosaédrica (esférico), nos ha permitido observar:

- Grupos de partículas esféricas asociadas al plasmalema, pudiéndose apreciar claramente la ausencia de pared celular (Fig 11, A).
- Agregados cristalinos formados por partículas de virus y localizados en las vacuolas o el citoplasma (Fig 11, B).
- Partículas esféricas aisladas, próximas a la membrana plasmática del protoplasto (Fig 11, C)
- Nunca hemos encontrado partículas de virus en el núcleo ni en sus proximidades.

1.4. Infección de protoplastos por virus

La inoculación de protoplastos por un purificado de virus se ha realizado siguiendo las directrices de Otsuki y Takebe (1973-1976) así como de Shalla y Petersen (1973), con las modificaciones ya indicadas. Los protoplastos, una vez inoculados con la mezcla "virus-poliominitina", fueron cultivados en el medio de Aoki y Takebe (1969) manteniéndolos 3 ó 4 días a 28°C con una iluminación constante de 2500 lux.

Pudimos llevar a cabo, por primera vez, la infección de protoplastos con virus del grupo Y de la patata: virus del mosaico del nabo (TuMV) y virus del mosaico amarillo de la judía (BYMV). Así mismo, logramos infectar protoplastos de tabaco con nuestro virus esférico, no caracterizado.

En todos los casos, la infección de protoplastos ha sido comprobada por microscopía electrónica y ensayos de infectividad.

Mediante microscopía electrónica hemos realizado un estudio de la infección viral, observando que los distintos virus han penetrado en el citoplasma, llegando a

alterar el metabolismo celular para la síntesis de sus propias proteínas.

Por recuento de los protoplastos observados, hemos estimado el porcentaje de la infección con cada uno de los virus, llegando a los siguientes resultados:

Virus	Especie vegetal	Protoplastos infectados
TuMV	Matthiola annua	60 %
BYMV	Vicia faba	35 %
ESFERICO	Nicotiana tabacum	28 %

El porcentaje de infección obtenido con el virus esférico es bastante inferior al postulado para el "virus del mosaico del pepino", mediante anticuerpos fluorescentes (Otsuki y Takebe, 1976), pero hay que hacer constar que nosotros sólo hemos considerado los protoplastos que se hallaban intactos y precisamente los infectados son más inestables y, por tanto, pueden haberse roto durante los procesos a que han sido sometidos.

También se han llevado a cabo "Ensayos de infectividad", con protoplastos infectados, para comprobar que la infección ha tenido lugar.

Los protoplastos, inoculados con distintos virus y cultivados, fueron homogeneizados a diferentes tiempos para servir de inóculo en ensayos de infectividad sobre hojas de *Chenopodium amaranticolor*. El máximo de lesiones producidas sobre dichas hojas, ha sido alcanzado a distintos tiempos de incubación según el virus utilizado, tal como se indica a continuación:

Virus inoculado a protoplastos	Máximo de lesiones por hoja	Tiempo de incubación
TuMV	41	62 horas
BYMV	30	80 horas
ESFERICO	43	70 horas

El proceso de la infección será tratado con más detenimiento al referirnos a las experiencias realizadas con cada virus en particular, habiéndonos limitado aquí a adelantar una breve síntesis de los resultados obtenidos.

2. EXPERIENCIAS REALIZADAS CON EL "VIRUS DEL MOSAICO DEL NABO" (TURNIP MOSAIC VIRUS, TuMV)

La fuente de obtención de este virus fueron plantas de alhelí (*Cherianthus cheiri*) encontradas en Madrid y que presentaban un mosaico acusado en las hojas con deformación, junto a un escaso desarrollo.

2.1. Sintomatología en plantas de ensayo

Un extracto de savia infectada con este virus ha sido inoculado mecánicamente a diversas plantas de ensayo, obteniendo los siguientes resultados:

Brassica napus: a los 10 ó 15 días de la infección aparece un ligero moteado que se generaliza dando lugar a zonas cloróticas acompañadas de líneas necróticas formando una especie de grabado (Fig 12, A).

Plantas que llevaban 30 días inoculadas produjeron anillos necróticos intensos acompañados de clorosis en las zonas próximas. Estos anillos necróticos nos hicieron saber que estábamos trabajando con una variedad denominada "virus del anillo necrótico de la col" (Cabbage black ring virus) (Fig 12, B).

Brassica oleracea: desarrolla pequeñas manchas necróticas que se observan muy bien en el envés de la hoja.

Matthiola annua: presenta un mosaico acusado acompañado de deformación leve de las hojas (Fig 13, A).

Cherianthus cheiri: produce un marcado mosaico con deformación de la hoja, todo ello unido a un retraso en el crecimiento de la planta (Fig 13, B).

Chenopodium quinoa: a los 15 - 20 días produce lesiones locales necróticas y cloróticas que terminan en un amarilleamiento total de la hoja (Fig 13, C).

Chenopodium amaranticolor: presenta lesiones cloróticas a los 10 - 15 días de la inoculación.

2.2. Purificación del virus

Para el aislamiento de este virus hemos utilizado una variante del método de Moghal y Francki (1976), que realiza un tratamiento con cloroformo y tetracloruro de carbono en tampón borato (evita la agregación del virus) aplicando posteriormente Tritón X-100. Generalmente hemos partido de 100g de hojas de alhelí que congelamos antes de comenzar el aislamiento.

Como comprobación de que el método de purificación ha sido bueno, realizamos tinciones negativas, con ácido fosfotungstico, de la suspensión final del virus purificado. Observamos que la preparación está limpia de cualquier contaminante y aparecen abundantes partículas de virus largas y flexuosas, como corresponde a un virus del grupo Y de la patata (Fig 14, A y B).

Podemos apreciar que estas partículas mantienen su individualidad, pues no han llegado a agregarse, si bien se observa una tendencia de las mismas a unirse entre sí por los extremos dando el falso aspecto de partículas muy largas. Su longitud principal está comprendida entre 700 - 800 nm (Gráfica 1).

2.3. Estudios espectrofotométricos

Como criterio de la pureza alcanzada por la suspensión del virus aislado, hemos procedido a realizar su espectro de absorción con luz ultravioleta obteniendo un espectro típico de nucleoproteínas, con un máximo de absorción a 260 nm y un mínimo a 240 nm (Gráfica 2). Hay que hacer notar que el tampón borato en que se hallaba diluído el virus pesee una gran densidad óptica a longitudes de onda inferiores a 240 nm, lo cual nos indujo a realizar las correcciones oportunas.

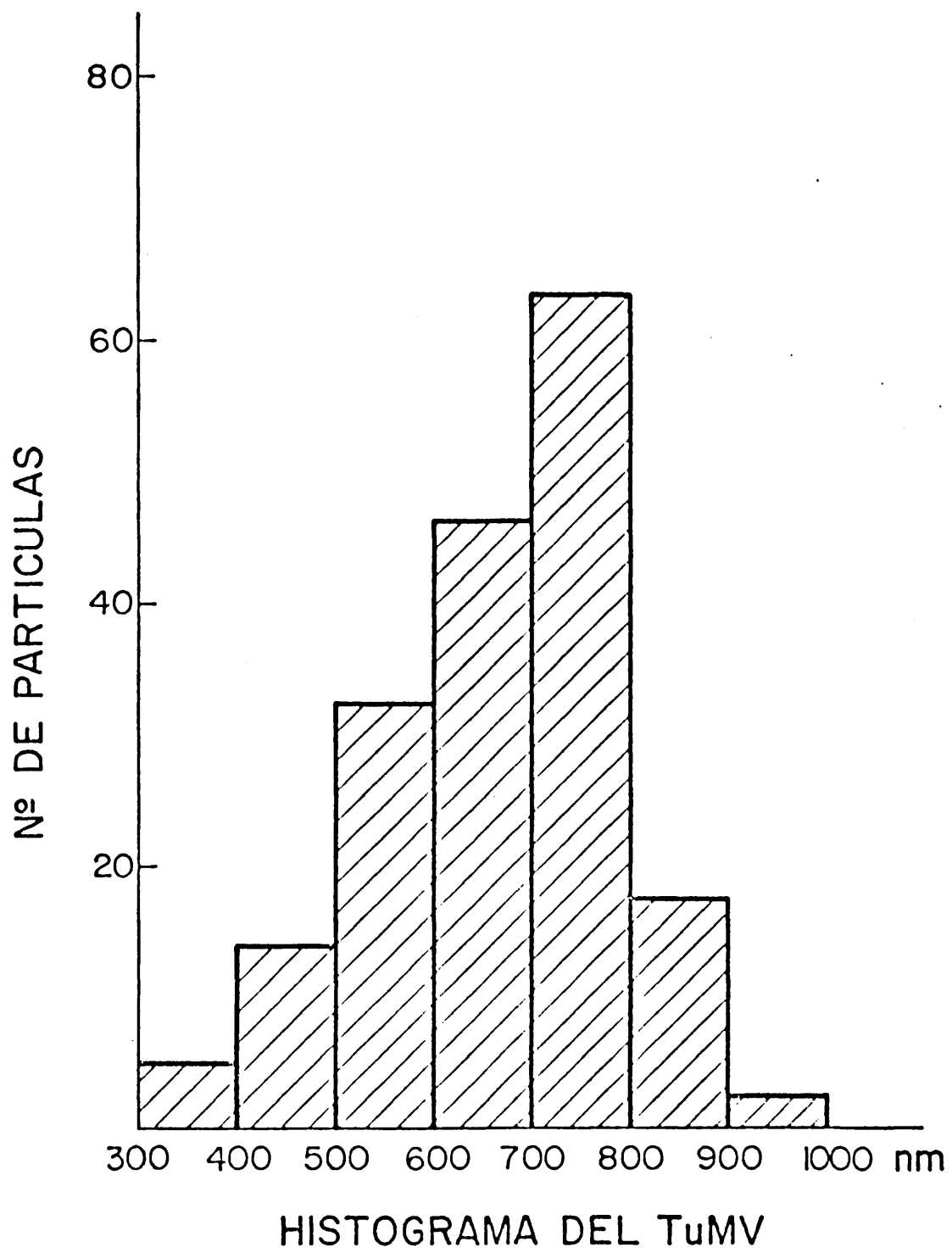


Fig. I

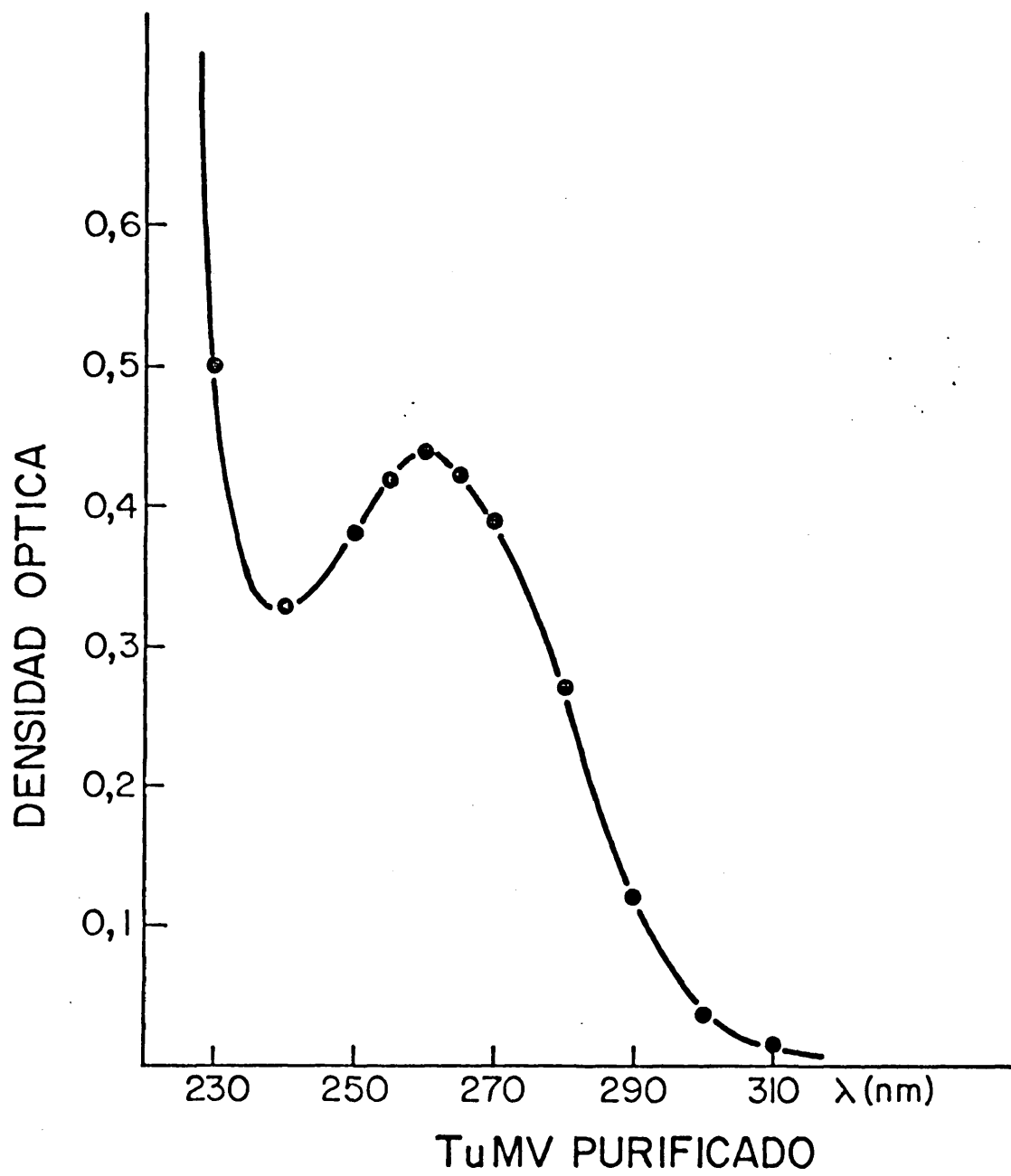


Fig. 2

La concentración y el rendimiento alcanzados en la purificación fueron calculados teniendo en cuenta que 1 mg de virus en 1 cm de recorrido de luz dá un coeficiente de extinción de 2,4 cm² a 261 nm (Purcifull, 1966):

$$A(260) = 3,2$$

$$\text{Relación de absorbancia } 260/280 = 1,38$$

$$\text{Relación de } E_{\text{max}}/E_{\text{min}} = 1,31$$

$$\text{Concentración del purificado} = 1,33 \text{ mg virus/ml}$$

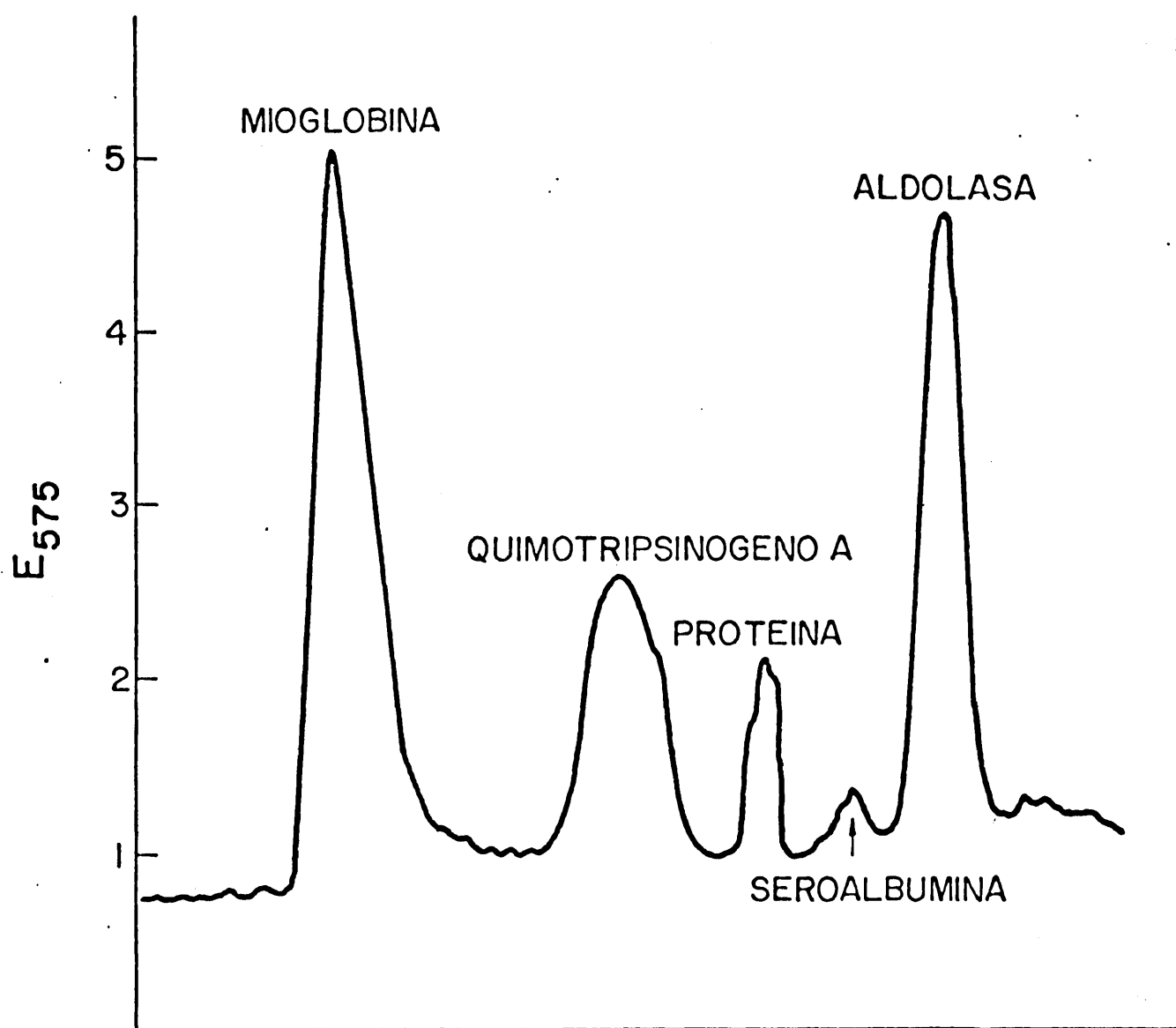
$$\text{Rendimiento} = 53,2 \text{ mg de virus/Kg de hojas}$$

La relación de absorción 260/280 nos indica un escaso contenido de ácido nucleico (RNA) en la partícula viral(5%) (Stace-Smith y Tremaine, 1970; Hill y Shepherd, 1972)

Los máximos rendimientos alcanzados por otros autores (McDonald y Hiebert, 1975) para este virus son del orden de 40 - 70 mg de virus/Kg de hojas, lo cual nos indica que hemos conseguido un buen rendimiento.

2.4. Determinación de la proteína viral

La electroforesis de la proteína constitutiva de la cubierta proteica del virus del mosaico del nabo (en gel de poliacrilamida), preparada por disociación directa del virus, nos dió como resultado una sólo banda (Fig 15 E).



DENSITOGGRAMAS DE GELES DE POLIACRILAMIDA
MOSTRANDO LA PROTEINA DEL TuMV

Fig. 3

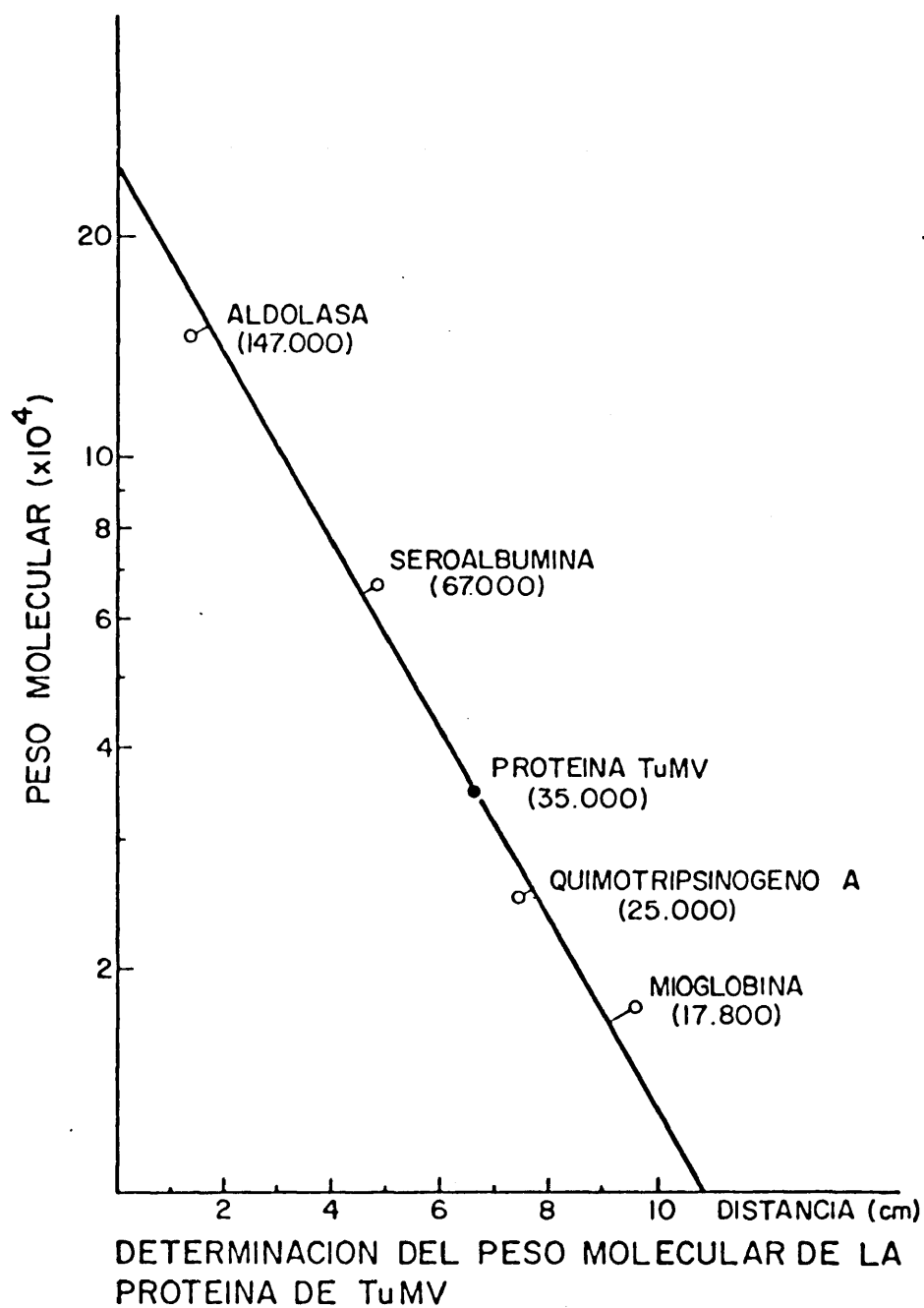


Fig. 4

El espectro de absorción de los geles a 575nm (absorción del azul de cumassina), también resuelve un sólo pico que coincide con la banda observada al teñir el gel (Gráfica 3).

El peso molecular fue calculado por comparación con proteínas conocidas y ha resultado ser de 35.000 daltons. La Gráfica 4 refleja la movilidad electroforética de la proteína del virus del mosaico del nabo, y las proteínas marcadoras, como una función lineal de sus pesos moleculares (en escala semilogarítmica).

2.5. Microscopía electrónica

En el estudio de este virus hemos utilizado las técnicas de tinción negativa y las de cortes ultrafinos.

2.5.1. Tinción negativa

En preparaciones de savia teñidas con P.T.A., sin fijación previa, hemos podido observar unas inclusiones que básicamente responden a dos modelos:

- 1º) Placas de forma alargada con estriaciones muy finas, paralelas unas a otras a lo largo del eje principal de la inclusión, dejando una

separación de 5 nm entre las estrías. Asociadas a estas inclusiones aparecen partículas de virus (Fig 15, A y B).

- 2º) Inclusiones irregulares formadas por partículas virales que se disponen de forma casi paralela unas a otras, siguiendo diversas orientaciones (Fig 15, C y D).

2.5.2. Ultraestructura de tejidos infectados

En secciones ultrafinas de *Brassica napus* y *Matthiola annua* se estudiaron las alteraciones celulares producidas por la infección viral, observándose las siguientes estructuras:

- 1º) "Inclusiones densas" distribuidas desordenadamente por todo el citoplasma. Suelen aparecer como barras dobles casi paralelas, lo que hace pensar que se trata de un cilindro que deja una matriz menos densa en su interior (Figs 16 y 17).

- 2º) "Inclusiones en forma de anillos gruesos" que corresponden, sin lugar a dudas, a las anteriores inclusiones cortadas transversalmente (Fig 16 A y B).

3º) "Inclusiones en forma de peine" (o cepillo, si tenemos en cuenta su estructura tridimensional), formadas por partículas paralelas de virus dispuestas regularmente como una empalizada que por un extremo se une a una inclusión densa y por el otro a una doble membrana (Fig 16, A y B). El origen de estas dobles membranas es desconocido, pudiendo pertenecer al retículo endoplasmico o mas probablemente haber sido inducidas por la presencia del virus.

4º) "Masas fibrilares" formadas por partículas de virus dispuestas paralelamente. Dichas partículas suelen hallarse próximas a vacuolas celulares y se ordenan fijándose por uno de sus extremos a un sistema de membrana (Fig 16 B y 17 A).

5º) "Haces de partículas" ordenadas regularmente que en corte transversal presentan un aspecto casi cristalino. El tamaño de estos haces es desigual y se disponen en todas direcciones dentro del citoplasma, no apreciándose ningún tipo de membrana que los envuelva; corresponden a las inclusiones en forma de peine o cepillo al ser cortadas perpendicularmente (Fig 17 A).

6º) "Inclusiones formando amplias placas" con cierta orientación longitudinal, uno de cuyos extremos se apoya sobre un sistema de doble membrana (Fig 18 A).

7º) "Estructuras complejas" constituidas por una gruesa banda asociada a otras más finas con aspecto de barras flexuosas, bucles y anillos, así como filamentos paralelos (probablemente partículas de virus). Estas inclusiones se encuentran próximas al núcleo y tienen una matriz formada por citoplasma con abundantes ribosomas y retículo endoplasmico como corresponde a zonas celulares con una intensa síntesis proteica (Fig 18, A y B).

En varias ocasiones hemos mencionado la existencia de "dobles membranas", cuyo origen es desconocido, asociadas a inclusiones de este virus. Hasta ahora no han sido descritas dichas membranas en tejidos infectados por el virus del mosaico del nabo, como tampoco aparecen en la literatura las "estructuras complejas" donde se hallan presentes todos los tipos de inclusión que produce este virus, pudiendo ser el lugar de síntesis de las mismas.

2.6. Infección de protoplastos por TuMV

Un purificado del virus del mosaico del nabo (TuMV), nos ha servido para inocular protoplastos de Matthiola annua que han sido capaces de soportar la multiplicación del virus en su interior. Un 60 % de los protoplastos observados poseían inclusiones virales en su citoplasma, habiendose observado:

- Inclusiones laminares densas (Fig 6 y 7)
- Anillos circulares o elípticos (Fig 7, B y C)
- Inclusiones en remolino o roseta (Fig 6 B y 7)

Estas inclusiones ya han sido descritas con detalle en el apartado correspondiente a la microscopía electrónica de protoplastos (1.3.2.), habiendonos servido para comprobar la infección de los protoplastos.

En secciones ultrafinas de protoplastos infectados (*Matthiola annua*) se reproducen las imágenes observadas en tejidos enfermos por la invasión de este virus, en plantas de alhelí. No hemos observado las "masas fibrilares" las "inclusiones en peine o cepillo", ni tampoco las grandes y "complejas estructuras" próximas al nucleo, que aparecen en los tejidos foliares de *Brassica napus* infectados por este virus.

Por tanto, la citología de protoplastos de *Matthiola annua*, infectados por TuMV, se corresponde con la exhibida por células de su misma especie que estan formando tejidos, pero no reproduce estructuras que este mismo virus es capaz de provocar en especies vegetales diferentes.

El proceso de multiplicación del virus en el interior de los protoplastos ha seguido un desarrollo muy

rápido, casi lineal, durante las 50 horas siguientes a la inoculación. A partir de este tiempo se estabiliza, produciendo un máximo de 41 lesiones por hoja de *Chenopodium amaranticolor* a las 62 horas de cultivo, tal como se indica en la Gráfica 5.

A distintos tiempos de incubación, se homogeneizaron porciones de 5 ml del cultivo de protoplastos inoculados para realizar ensayos de infectividad, obteniéndose los siguientes resultados:

<u>Tiempo de incubación</u>	<u>Nº de lesiones/hoja</u>
0 horas	0
15 horas	12
48 horas	37
62 horas	41
72 horas	38

Los ensayos de infectividad se realizaron sobre medias hojas de *Chenopodium amaranticolor*, procediéndose al recuento de las lesiones que se produjeron a los 10 días de la inoculación.

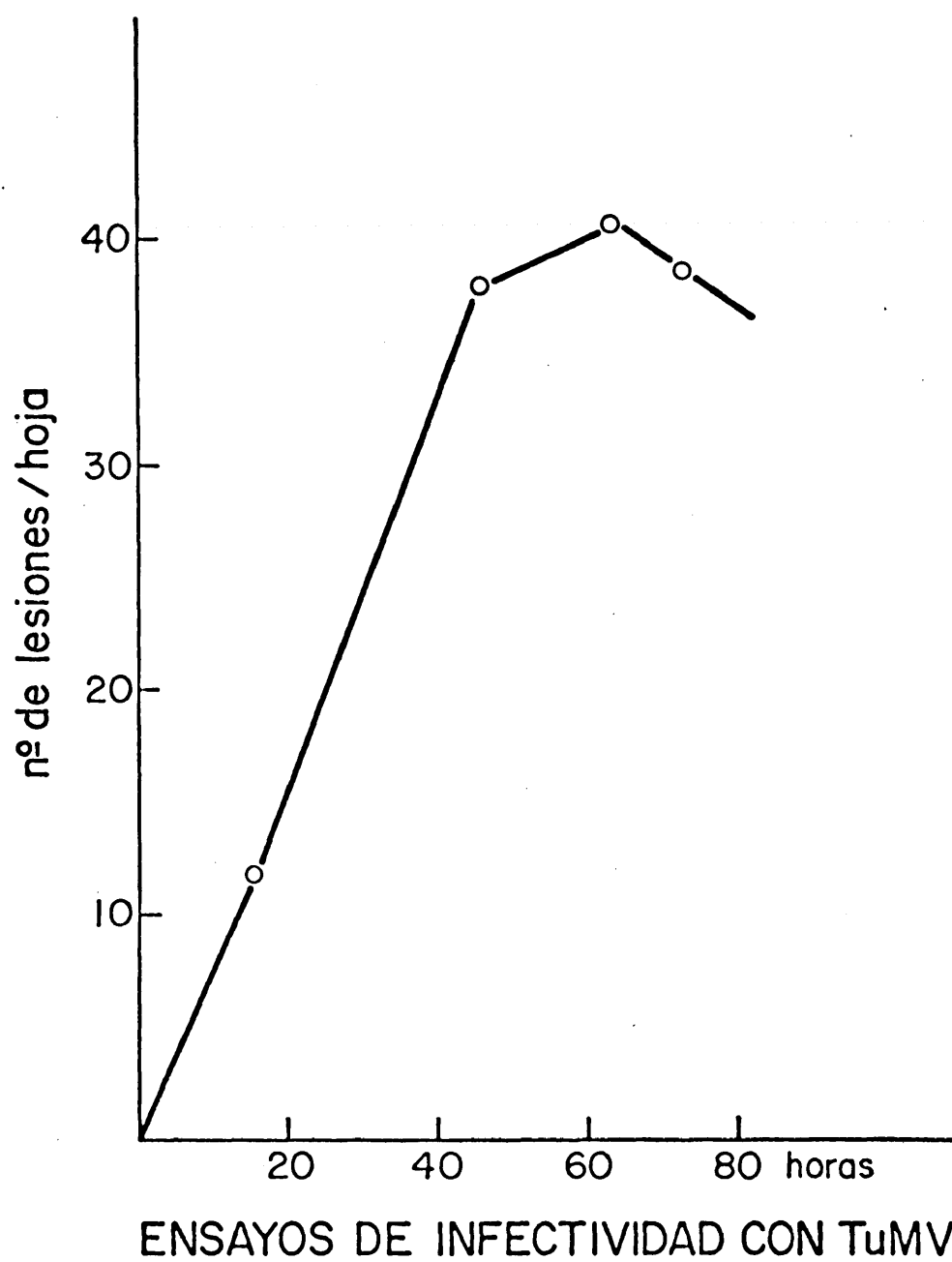


Fig.5

3. EXPERIENCIAS REALIZADAS CON EL "VIRUS DEL MOSAICO AMARILLO DE LA JUDIA (BEAN YELLOW MOSAIC VIRUS, BYMV)

La procedencia de esta muestra de virus, fueron plantas de habas (*Vicia faba*) recogidas en un cultivo del término de Aranjuez (Madrid) que presentaban un mosaico intenso en las hojas junto a un escaso desarrollo de las plantas.

3.1. Sintomatología en plantas de ensayo

Mediante inoculación mecánica hemos transmitido este virus a diversas plantas de ensayo, cuya sintomatología ha sido la siguiente:

Vicia faba, var. "Aguadulce": desarrolla un moteado intenso que se extiende a toda la hoja, así como clorosis en las venas seguida de un mosaico acusado en las hojas, las cuales no suelen sufrir distorsión alguna (Fig 19, A y B).

Phaseolus vulgaris: produce manchas cloróticas que a menudo se extienden a las venas. Junto al mosaico amarillo de las hojas suele producirse un curvamiento y malformación en las mismas.

Chenopodium amaranticolor: a los 15 días de su inoculación empiezan a aparecer lesiones cloróticas acompañadas de un amarilleamiento en los nervios. Termina desarrollando una clorosis total donde persisten pequeños anillos necróticos junto a una necrosis acusada en el borde de la hoja (Fig 19 C).

Chenopodium quinoa: desarrolla escasas lesiones cloróticas (algo mayores que Ch. amaranticolor) que se generalizan a toda la planta acompañadas de un amarilleamiento suave (Fig 19 D).

3.2. Purificación del virus

Hemos partido de 100g de hojas de Vicia faba, congeladas previamente para facilitar el proceso de aislamiento. Como indicamos en el capítulo dedicado a Material y Métodos, este virus ha sido purificado por el método de Moghal y Francki (1976) mediante precipitación por polietilenglicol-6000.

El virus purificado fue observado en tinción negativa con P.T.A., apareciendo con forma de filamentos largos y flexuosos (típicos del grupo de los Potyvirus) que han sido medidos dando una longitud principal compren-

dida entre 700 y 800 nm (Gráfica 6).

Por microscopía electrónica, hemos comprobado que el método seguido ha evitado los inconvenientes que presenta la purificación de este virus, observando las partículas de virus sin contaminantes y sin agregarse, pues el tampón borato, en que ha sido aislado, anula la tendencia de este tipo de virus a la aglutinación (Fig 20 A).

3.3. Estudios espectrofotométricos

Hemos realizado el espectro de absorción con luz ultravioleta del purificado obtenido, apareciendo un máximo a 260 nm y un mínimo a 240 nm, como corresponde a una suspensión de nucleoproteínas (Gráfica 7). Igual que con el TuMV, el tampón borato nos enmascaró los resultados, teniendo que realizar las correcciones pertinentes. Obtuvimos los siguientes resultados:

$$A(260) = 3,0$$

$$\text{Relación de absorbancia } 260/280 = 1,33$$

$$\text{Relación de } E_{\text{max}}/E_{\text{min}} = 1,2$$

$$\text{Concentración del purificado} = 1,25 \text{ mg virus/ml}$$

$$\text{Rendimiento} = 30 \text{ mg de virus/kg de hojas}$$

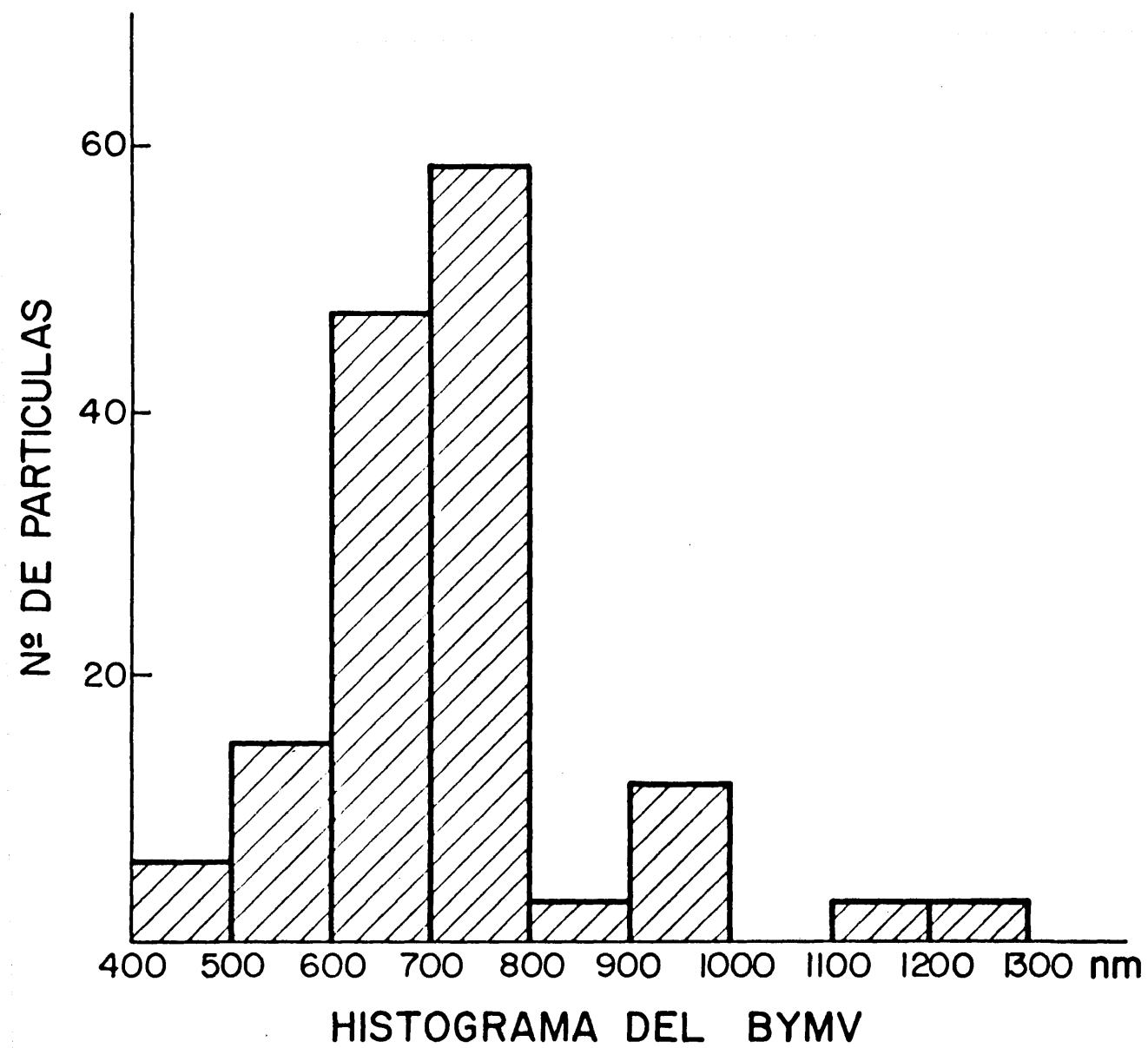


Fig.6

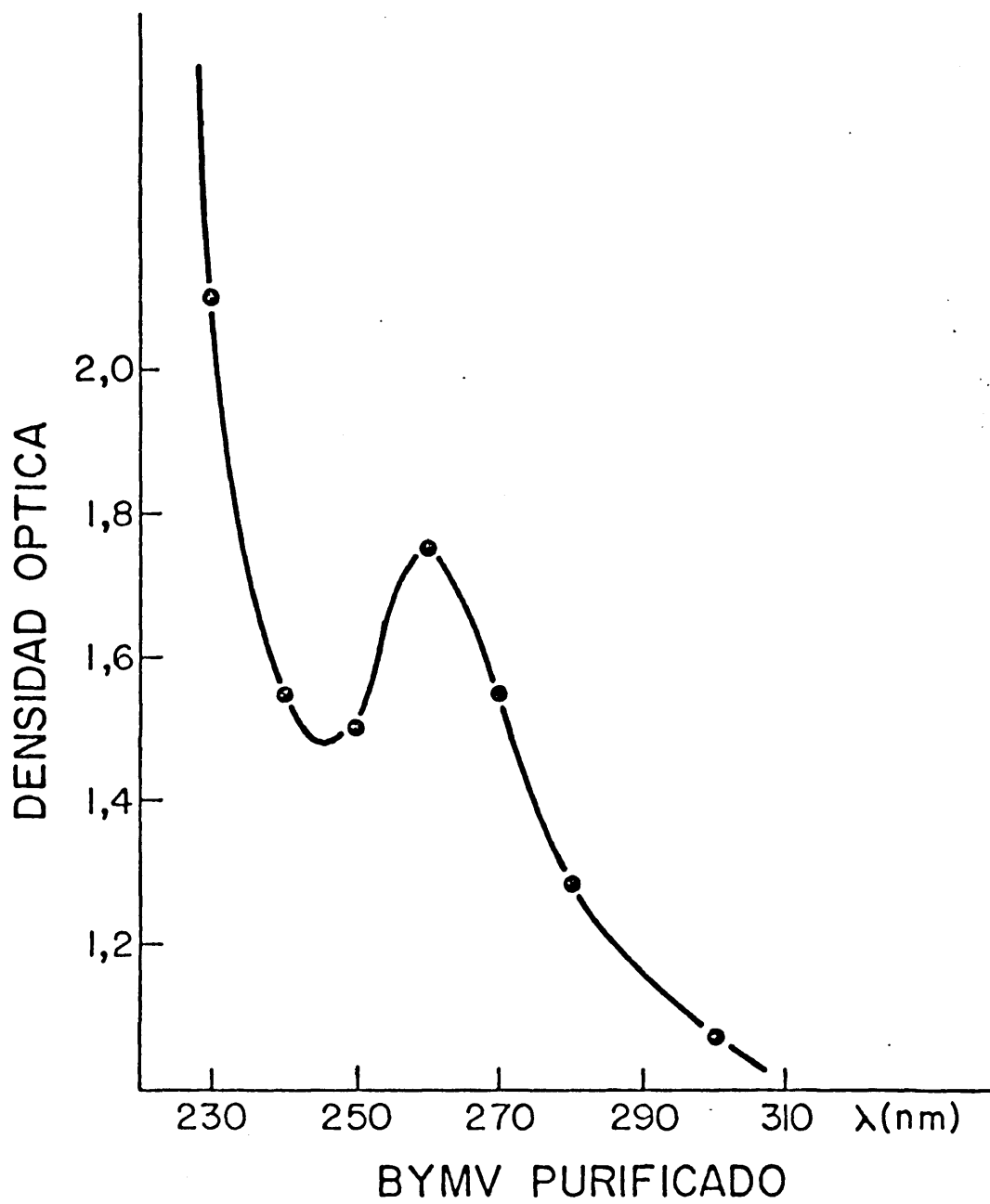


Fig. 7

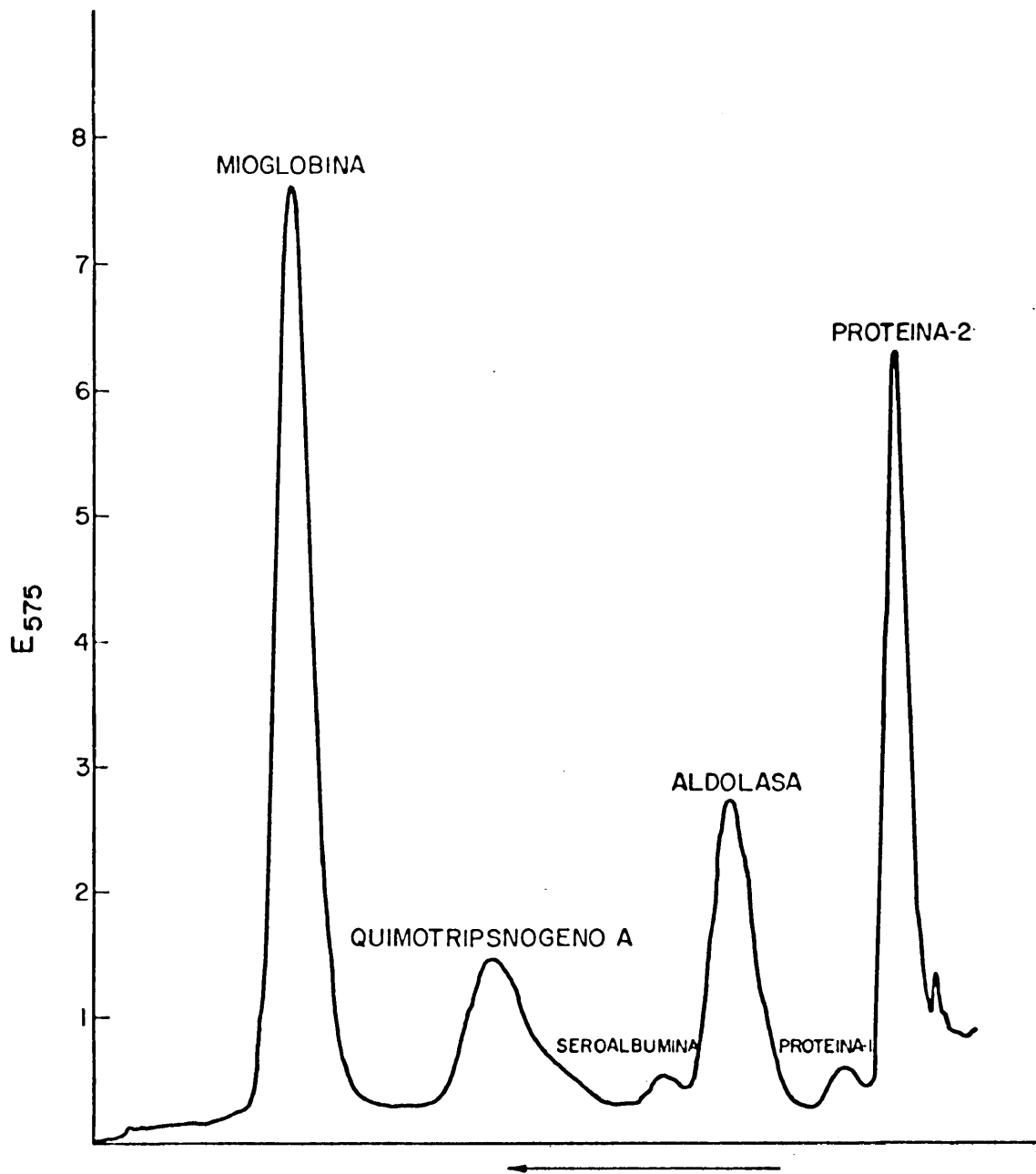
La concentración de virus fué estimada usando un coeficiente de extinción de $2,4 \text{ cm}^2 / \text{mg}$ a 261 nm (Purcifull, 1966). El radio de absorción 260/280 sugiere un contenido en RNA relativamente bajo (5%) (Damirdagh y Shepherd, 1970; Hill y Shepherd, 1972).

3.4. Determinación de las proteínas virales

La electroforesis de la cubierta proteica del virus en gel de poliacrilamida, resuelve dos bandas próximas que han realizado un escaso recorrido, a las cuales corresponde un componente rápido y otro lento (Fig 20 C).

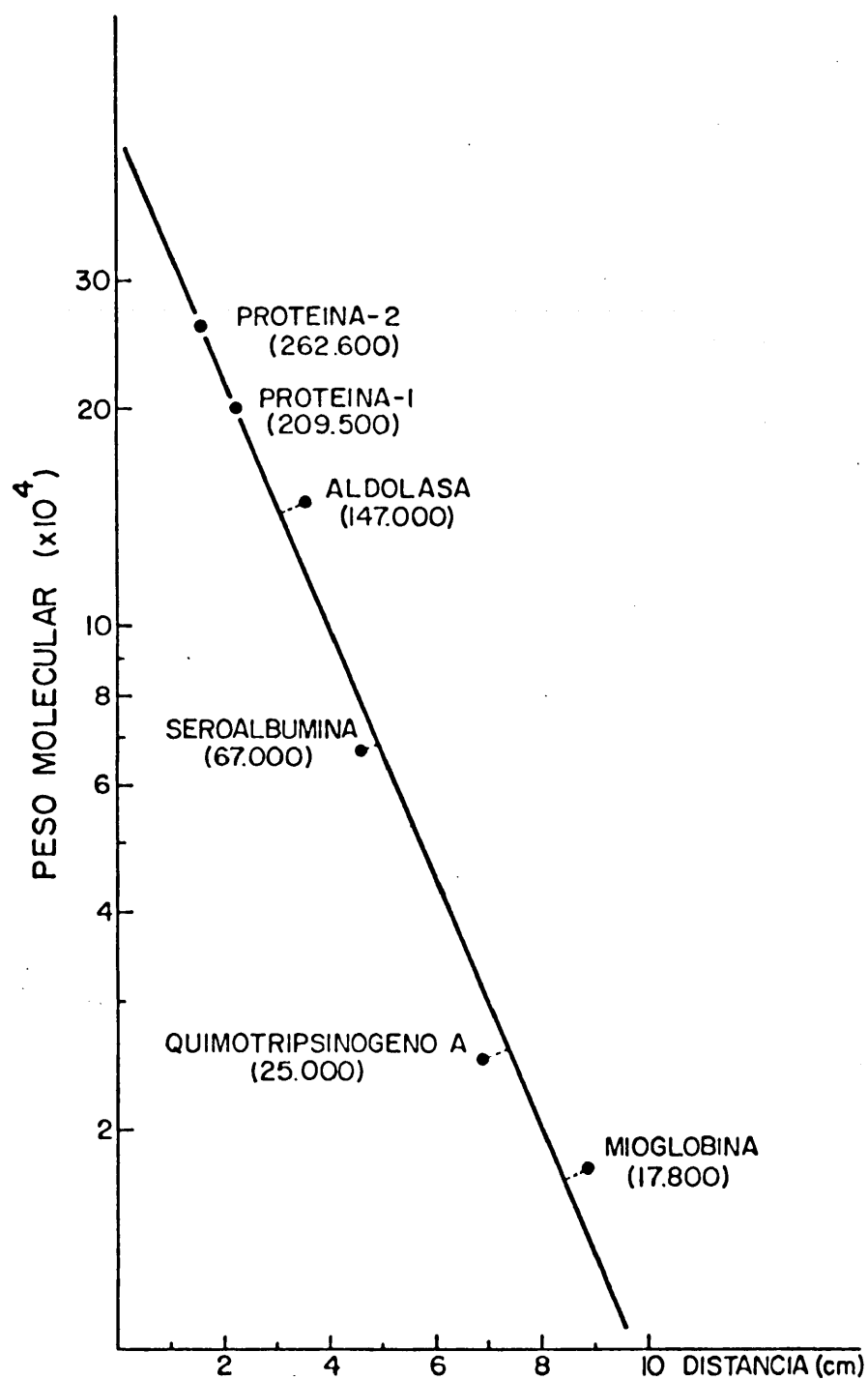
El espectro de absorción de estos geles a 575 nm (absorción del azul de cumassina) dá como resultado dos picos próximos aunque claramente definidos, correspondientes a las bandas que aparecen al teñir los geles (Gráfica 8)

Los pesos moleculares fueron calculados por comparación con proteínas conocidas resultando unos valores medios de 209.500 daltons para la proteína rápida y 262.600 para la lenta (error = 2,1%) (Gráfica 9). Estos valores son excesivamente altos para tratarse de la proteína viral que forma los monómeros y concretamente son 6 veces más elevados que los calculados para este virus, lo



DENSITOGGRAMAS DE GELES DE POLIACRILAMIDA MOSTRANDO LAS PROTEINAS DEL BYMV

Fig 8



DETERMINACION DE LOS PESOS MOLECULARES
DE LAS PROTEINAS DE BYMV

Fig. 9

que nos hace suponer que la cápside del virus estaría formada por capsómeros con 6 subunidades cada uno (monómeros). Estas 6 proteínas deben hallarse unidas entre sí por fuerzas electrostáticas intensas y puentes de hidrógeno que no han podido ser destruidos liberando los monómeros básicos, que serían subunidades de 34.700 y 35.000 daltons respectivamente.

3.5. Microscopía electrónica

Hemos estudiado la ultraestructura de este virus por tinción negativa y cortes ultrafinos.

3.5.1. Tinción negativa

En preparaciones de savia teñidas con P.T.A., hemos podido observar unas partículas filamentosas no rectas que se corresponden en aspecto y tamaño con las obtenidas en preparaciones purificadas de virus (Fig 20, A y B).

También en savia, hemos podido observar unas inclusiones en forma de ovillo donde se aprecia que están constituidas por partículas de virus enrolladas (Fig 20 B)

3.5.2. Ultraestructura de tejidos infectados

En secciones ultrafinas de hojas jóvenes de Vicia faba, var. "Aguadulce" infectadas con el BYMV, hemos encontrado una serie de estructuras y alteraciones que indicamos a continuación:

1º) "Bandas electro-densas" de gran longitud y grosor variable que en profundidad corresponden a láminas puesto que se continúan en varios cortes seriados. Suelen tener un recorrido bastante recto aunque, en ocasiones, los extremos aparecen enrollados (Fig 21, A y B).

2º) "Inclusiones en barras flexuosas" de distinta longitud y grosor que en ocasiones salen de un punto común, siguiendo un cierto orden helicoidal (Fig 22 A y B).

3º) "Pequeñas formaciones fibrilares", incluyendo ribosomas en su interior. Los filamentos de que están compuestas, parecen ser partículas de virus y generalmente se encuentran entrecruzadas con las inclusiones anteriores (Fig 22 C).

4º) "Cristales de proteína", muy densos electrónicamente que aparecen, en grandes cantidades, asociados a la infección por este virus. Están formados por subunidades esféricas que, por aposición, van incrementando el tamaño del cristal (Fig 22, A y C)

5º) "Cloroplastos alterados", presentando un aspecto peculiar, pues los paquetes de granas se unen entre sí por los extremos formando una larga cadena que llega a cerrarse sobre sí misma, modificando la estructura lamelar del cloroplasto. Estos cloroplastos poseen en su interior gotas de material lipídico muy denso a los electrones así como ribosomas reunidos en pequeños grupos (Fig 23 A y C).

6º) "Estructuras membranosas mielínicas", formadas por dobles membranas que se disponen formando círculos o elipses concéntricos, cuya membrana más externa permanece unida al plasmalema o al tonoplasto. Se encuentran en las vacuolas de células infectadas, formandose en primer lugar las capas más externas y despues se originan nuevos sistemas de dobles membranas hacia el interior (Fig 23 C y D).

7º) "Los nucleolos" de células infectadas, suelen aparecer divididos en sus dos porciones típicas, una de las cuales se presenta vacuolada y con aspecto granular denso, observandose esta morfología nucleolar con gran frecuencia y más claramente que en células sanas (Fig 23 B).

Estas tres ultimas alteraciones celulares que hemos observado en tejidos infectados por el BYMV no han sido descritas para este virus, mientras que las inclusio-

nes virales han servido tradicionalmente, para identificar a este virus de leguminosas.

3.6. Infección de protoplastos por BYMV

Un purificado del virus del mosaico amarillo de la judía (BYMV), nos sirvió de inóculo para infectar protoplastos jóvenes de *Vicia faba*, var. "Aguadulce" lográndose multiplicar el virus en un 35 % de los casos observados.

El estudio de la multiplicación del virus dentro del protoplasto ha sido realizado por microscopía electrónica pudiéndose observar las mismas inclusiones que en el caso de tejidos infectados, es decir:

- "Barras densas" de longitud variable (Fig 8 A)
- "Cristales de proteína" (Fig 8 A y B)
- "Estructuras fibrilares" (Fig 9 A)

Ninguna de las demás estructuras observadas en el tejido se han visto en el interior de protoplastos infectados y las inclusiones en "barra" nunca llegan a formar las enormes "bandas electro-densas" que aparecen en hojas infectadas.

Por otro lado, al infectar protoplastos aparecen unas estructuras que no se aprecian en secciones ultrafinas de tejidos, formadas por largos "túbulos" rectos y delgados rodeados por masas de citoplasma muy osmíófilas que van siendo lanzadas hacia la vacuola central, como ya se explicó en el apartado dedicado a la microscopía electrónica de protoplastos (1.3.2.). Este fenómeno no ha sido observado con anterioridad y parece como si el protoplasto se defendiera de proteínas extrañas, envolviéndolas y lanzando-las a la vacuola (Fig 9 C y 10).

Al igual que el anterior Potyvirus objeto de nuestro estudio, el proceso de replicación de este virus en protoplastos ha seguido un crecimiento lineal durante las primeras 40 horas siguientes a la infección, como lo demuestra el aumento progresivo de lesiones por hoja que producen los homogeneizados de protoplastos inoculados sobre hojas de *Chenopodium amaranticolor*:

<u>Tiempo de incubación</u>	<u>Nº de lesiones/hoja</u>
0 horas	2
0,5 horas	0
20 horas	11
40 horas	28
60 horas	32
80 horas	30

La infectividad que presentan protoplastos extraídos y homogeneizados a tiempo cero se considera debida a partículas de virus que han quedado adsorbidas o adheridas a los protoplastos y que, al no haber sido eliminadas en los lavados sucesivos, conservan su infectividad.

Los protoplastos infectados que fueron homogeneizados tras mantenerlos 60 - 80 horas en cultivo, poseen una infectividad estacionaria pues ya no aumenta el nº de lesiones/hoja que son capaces de producir, alcanzando un máximo de 32 lesiones/hoja (Gráfica 10).



Fig. 10

4. EXPERIENCIAS REALIZADAS CON EL VIRUS ESFERICO

Este virus fue encontrado en plantas de espinacas (*Spinacea oleracea*) de la provincia de Valencia y el término municipal de Aranjuez (Madrid), que presentaban un ligero moteado y distorsiones en las hojas, junto a un escaso desarrollo. Parece tratarse de un virus esférico relacionado con el grupo de los Cucumovirus (virus del mosaico del pepino), pero con características peculiares según se discutirá mas adelante.

4.1. Sintomatología en plantas de ensayo

Este virus ha sido transmitido mecánicamente a diversas plantas de ensayo, donde ha producido los siguientes síntomas:

Nicotiana tabacum, var. "White Burley": desarrolla a los 5 ó 6 días lesiones necróticas y posteriormente comienza a aparecer un mosaico generalizado (Fig 24, A).

Nicotiana glutinosa: produce un mosaico acusado con deformación de las hojas y reducción en el tamaño de la planta

Spinacea oleracea: produce un mosaico muy suave junto a distorsiones de la hoja y pequeños crecimientos anormales ("enations"). El tamaño de la planta enferma se reduce considerablemente (Fig 24 B).

Petunia hybrida: desarrolla una infección generalizada, con enanismo, distorsión de las hojas y disminución en el desarrollo de la planta (Fig 24 C).

Chenopodium amaranticolor: desarrolla lesiones necróticas a los 5 ó 6 días de la inoculación (Fig 24 D).

En plantas de Phaseolus vulgaris, Vicia faba y Apium graveolens no desarrolla ninguna sintomatología.

4.2. Purificación del virus

Este virus fue aislado a partir de hojas infectadas de *Nicotiana tabacum* var. "White Burley" o *Spinacea oleracea*, utilizando cloroformo para desproteínizar y PEG-6000 para precipitar el virus (Lot, 1972).

Trás su purificación fue observado en tinción negativa con P.T.A., sin fijación y con élla, no apreciando diferencias entre una preparación y otra; en ambos casos,

aparecían pequeñas partículas esféricas que tienden a agregarse para cristalizar (Fig 25 A y B). También se observó el virus en tinción positiva con acetato de uranilo, apreciándose las partículas con gran nitidez (Fig 25 C). Dichas partículas han sido medidas y poseen un diámetro de 27 nm.

4.3. Estudios espectrofotométricos

Como criterio de la pureza alcanzada por la suspensión purificada del virus, realizamos su espectro de absorción con luz ultravioleta obteniendo un espectro típico de nucleoproteínas (Gráfica 11), con los siguientes valores:

$$A(260) = 4,4$$

$$\text{Relación de absorbancia } 260/280 = 1,63$$

$$\text{Relación de } E_{\text{max}}/E_{\text{min}} = 1,33$$

$$\text{Concentración del purificado} = 3,52 \text{ mg virus/ml}$$

$$\text{Rendimiento} = 70,2 \text{ mg de virus/Kg de hojas}$$

La relación de absorción 260/280 nos indica un alto porcentaje de RNA en la partícula (Kaper y col. 1965). La concentración del purificado se ha calculado teniendo en cuenta que 1 mg de virus en 1 cm de recorrido de luz da una absorción de 5,0 a 260 nm.

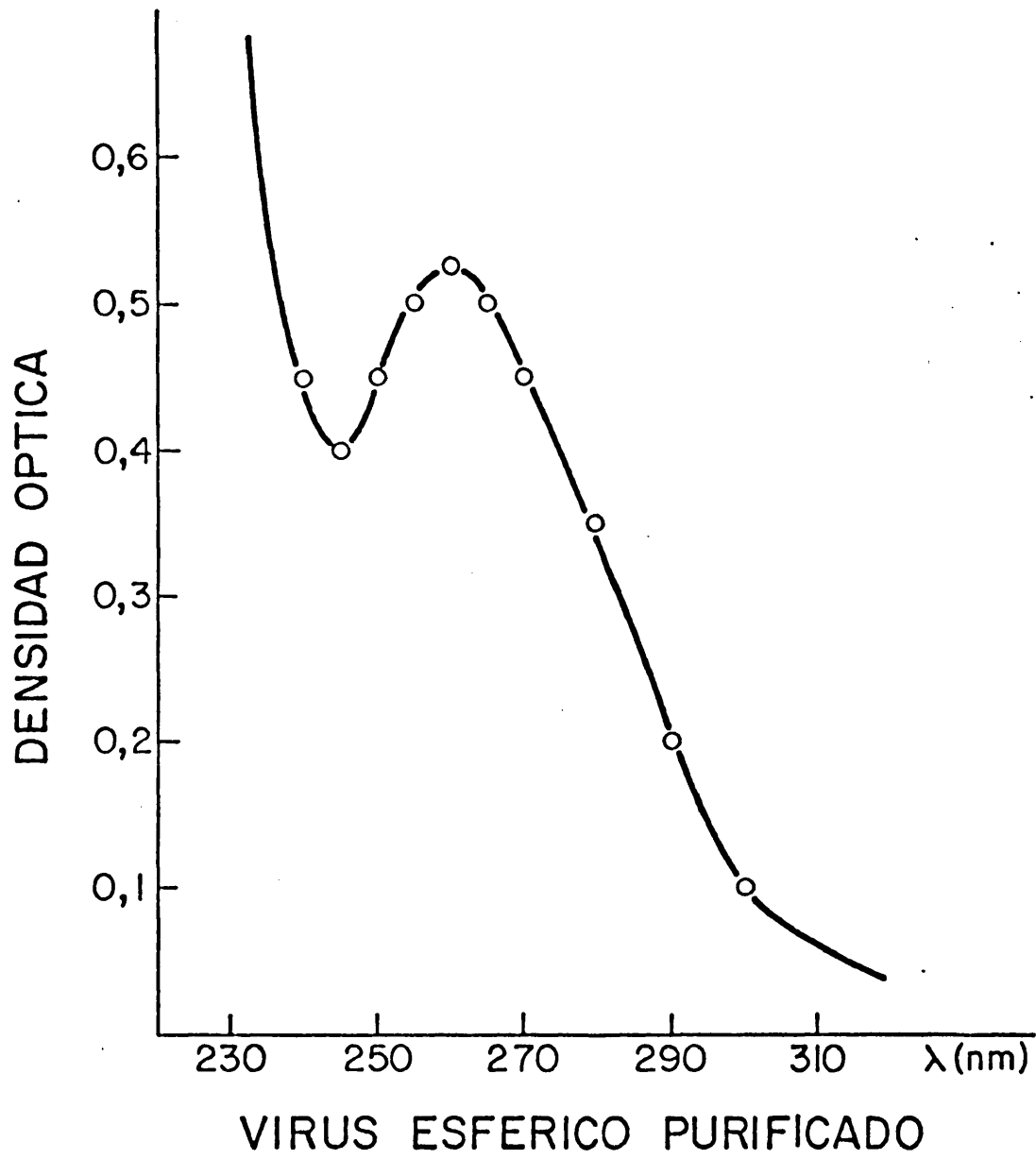


Fig. II

4.4. Características físico-químicas

Continuando el estudio de este virus, que nos pareció interesante porque podría tratarse de una nueva es tirpe del "virus del mosaico del pepino" (Cucumber mosaic virus, CMV), muy estable, hemos realizado una serie de de terminaciones con el fin de caracterizarlo:

1º) Punto térmico de inactivación: La tempera tura a que el virus en savia deja de ser infectivo, esta comprendida entre 55 - 60°C, calentando durante 10 minutos.

2º) Longevidad del virus "in vitro": el virus purificado, diluido en agua destilada o tampón citrato, re siste durante 15 días a 4°C sin alterar su estructura ni perder infectividad.

3º) Serología: un purificado de virus se colo có frente a antisueros del virus del mosaico del pepino, produciendo una intensa línea de reacción, lo cual indica que ambos virus se hallan estrechamente relacionados.

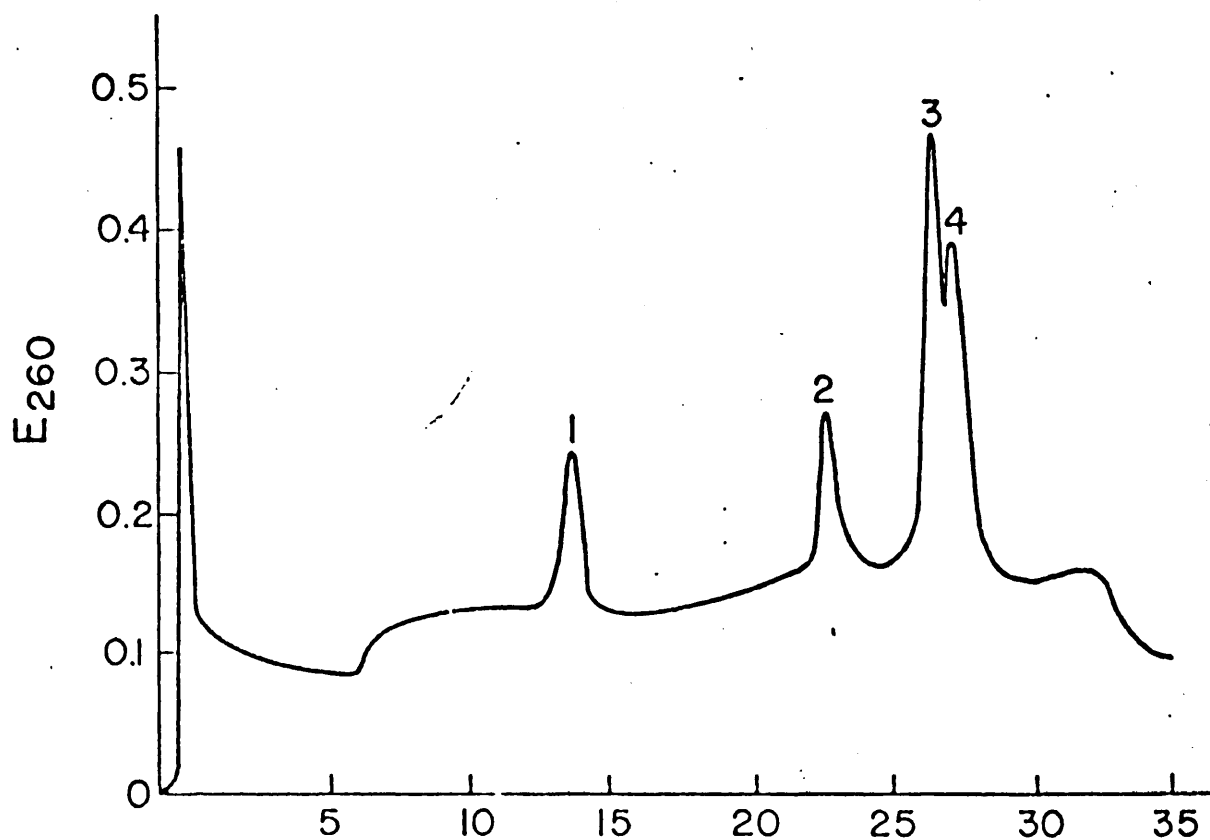
4.5. Determinación del ácido nucleico viral

Hemos realizado la electroforesis en geles de poliacrilamida (2,9 % de acrilamida) del RNA de este virus a partir de preparaciones purificadas y disociadas posteriormente (Lane, 1974).

Su electroforesis resuelve cuatro componentes que al teñir con azul de toluidina, aparecen como cuatro bandas, dos de ellas muy próximas aunque claramente diferenciadas (Fig 25 D). La realización del espectro de absorción de estos geles con luz ultravioleta (sin teñir) y luz visible (teñidos) ha confirmado que se trata de cuatro RNAs pues aparecen cuatro picos de absorción, dos de ellos muy juntos (picos 3 y 4) y que corresponden a los RNAs más rápidos puesto que han recorrido una mayor distancia (Gráfica 12).

Los porcentajes cuantitativos de los cuatro componentes del RNA viral han sido determinados sobre los espectros de absorción de los geles, cortando y pesando la superficie correspondiente a cada pico sobre una línea base (Lot y Kaper, 1976), obteniendo los siguientes valores:

RNA-1	15,5665 % del total
RNA-2	18,5360 % del total



Densitogramas de geles de poliacrilamida mostrando la separación de los diferentes ARN

Fig. 12

RNA-3	36,4200 % del total
RNA-4	29,4760 % del total

4.6. Microscopía electrónica

En el estudio de este virus hemos utilizado las técnicas de tinción negativa para observar preparaciones purificadas y los métodos de cortes untrafinos para conocer la citología de plantas infectadas.

4.6.1. Tinción negativa

En savia de plantas infectadas no nos fue posible observar el virus, tanto si las tinciones fueron realizadas con P.T.A.(fijando con formaldehído o sin fijar) , como con acetato de uranilo.

En preparaciones purificadas pudimos observar perfectamente partículas de virus que aparecen con forma esférica y, a veces, con un punto oscuro en el centro lo que se ha interpretado como ausencia de ácido nucleico en el interior de la cápside que queda hueca (Fig 25 A y B).

4.6.2. Ultraestructura de tejidos infectados

Hemos estudiado la ultraestructura que presentan plantas inoculadas con este virus en un estado avanzado de la infección, pudiendose apreciar:

1º) "Partículas redondeadas de virus", localizadas en el núcleo y próximas al nucleolo. Se presentan aisladas o en grupos pequeños y eventualmente tienden a asociarse intentando cristalizar (Figs 26 y 27). Estas partículas tienen apariencia de túbulos huecos, pero se descartó esta posibilidad porque siempre se presentan con un aspecto homogéneo y regular, aunque los cortes de tejido se han realizado en todas direcciones.

2º) Con escasa frecuencia, hemos observado unas estructuras de aspecto "fibrilar" en contacto con el nucleolo (Fig 27 C).

No hemos encontrado partículas de virus en el citoplasma. Los orgánulos celulares (cloroplastos, mitocondrias ...etc) presentan un aspecto normal, no habiendo partículas virales asociadas a ellos.

4.7. Infección de protoplastos por el virus esférico

Un purificado de este virus, posiblemente una nueva raza del "virus del mosaico del pepino", nos sirvió para inocular una suspensión de protoplastos de *Nicotiana tabacum*, var. "White Burley". Logramos la infección en un 28 % de los protoplastos examinados, haciendo notar que los mejores porcentajes de la infección los conseguimos re suspendiendo los protoplastos en manitol 0,7 M y cloruro cálcico 0,1 mM inmediatamente antes de la inoculación.

El estudio de la replicación del virus en el interior de protoplastos, se ha llevado a cabo por microscopía electrónica pudiendo observar que, contrariamente a lo que ocurre con tejidos infectados, el virus se localiza en el citoplasma y no en el núcleo celular. Hemos conseguido ver:

- Grupos de partículas esféricas en el citoplasma (Fig 11 A).
- Agregados cristalinos de partículas virales (Fig 11 B).
- Partículas esféricas aisladas (Fig 11 C).

Ningun tipo de partícula ha sido encontrada en el núcleo de protoplastos infectados.

Estos resultados tan opuestos a los obtenidos con secciones ultrafinas de hojas infectadas, no debe extrañarnos demasiado si tenemos en cuenta que podría tratarse de una más entre la gran diversidad de razas existentes del "virus del mosaico del pepino", un virus de plantas esférico del que apenas se conoce la ultraestructura de su infección (Doi y col. 1965; Doi y Yora, 1972 ; Honda y Matsui, 1974).

El desarrollo de la multiplicación del virus en protoplastos inoculados ha sido estudiado por ensayos de infectividad. A los tiempos indicados a continuación, fueron extraídas y homogeneizadas porciones de protoplastos infectados para realizar ensayos de infectividad, obteniendo los siguientes resultados:

<u>Tiempo de incubación</u>	<u>Nº de lesiones/hoja</u>
0 horas	0
15 horas	19
40 horas	33
70 horas	43
90 horas	41

El máximo de lesiones producidas se alcanzó con extractos de protoplastos inoculados que llevaban 70 horas en cultivo, siendo este momento el elegido para

observar la ultraestructura de los protoplastos.

Representando gráficamente el tiempo que los protoplastos infectados han sido mantenidos en el medio de incubación frente al número de lesiones que han producido sus extractos sobre hojas de *Chenopodium amaranticolor*, observamos que la curva indica un crecimiento casi exponencial como corresponde a la replicación del virus dentro del protoplasto (Gráfica 13).

Los ensayos de infectividad se realizaron sobre medias hojas de *Chenopodium amaranticolor* que desarrollaron lesiones locales a los 10 días de la inoculación.

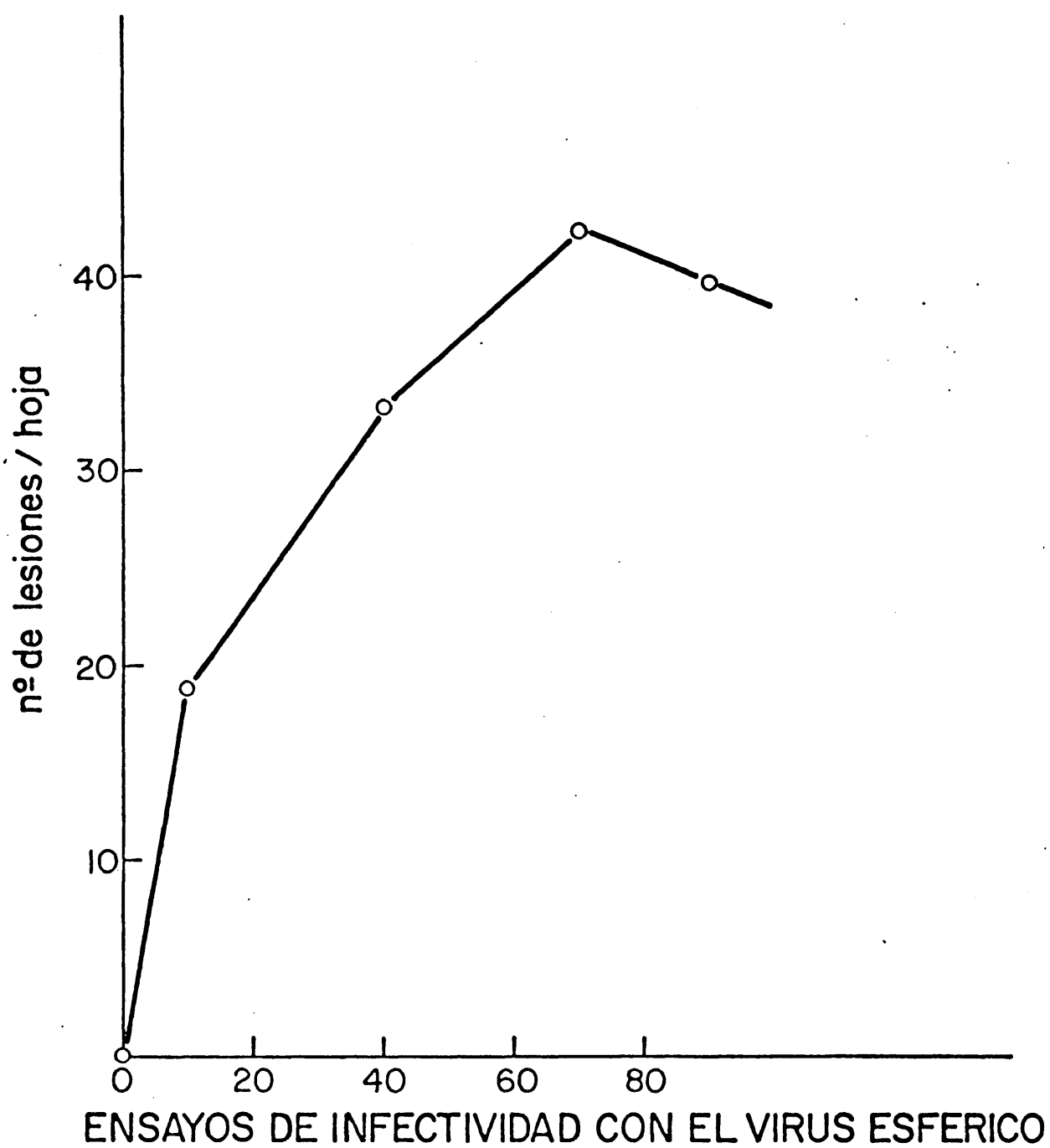


Fig. 13

CAPITULO IV. DISCUSION

A lo largo del trabajo realizado, hemos desarrollado el programa previsto, es decir, la obtención de protoplastos vegetales y el cultivo de algunos virus en el interior de ellos, dedicando especial atención a las alteraciones citológicas que se producen dentro del protoplasto infectado, comparándolas con las que estos mismos virus producen en tejidos de plantas.

A continuación examinamos críticamente los resultados obtenidos.

1. TRABAJO REALIZADO SOBRE PROTOPLASTOS

1.1. Producción de protoplastos

La obtención de protoplastos ha sido llevada a cabo por diversos métodos enzimáticos, consiguiendo en todos los casos un elevado rendimiento de protoplastos intactos (60 - 90 % del total de células). Entendemos por protoplastos "intactos" aquellos que aparecen completamente esféricos al microscopio óptico y que, por tanto, responde a la presión osmótica del medio en que se encuentran. Suelen presentarse con los cloroplastos dispuestos en la periferia, dejando una gran vacuola en el centro.

Siempre hemos utilizado un tratamiento conjunto de celulasa y pectinasa (Power y Cocking, 1970) en la obtención de protoplastos, evitando de este modo el peligro de la contaminación al no tener que renovar la solución enzimática. Tiene el inconveniente de que resulta más probable la fusión de protoplastos durante el aislamiento o posterior cultivo (Withers y Cocking, 1972) pero hemos salvado dicho obstáculo mediante una pre-plasmolisis en sacarosa antes de la digestión enzimática (Davey, 1973).

La aplicación de una solución diluida de enzimas (Chupeau y col. 1974) durante un tiempo prolongado (14-16 horas) nos ha permitido alcanzar los mejores resultados con todas las especies utilizadas. Según Gosch y col. (1975) un largo tratamiento enzimático puede dañar el plasmalema perjudicando la regeneración de paredes celulares, pero nosotros hemos obtenido protoplastos viables que resintetizaron una nueva pared y soportaron repetidas divisiones. Esto puede explicarse teniendo en cuenta que la solución enzimática utilizada está muy diluida y no ha llegado a lesionar la membrana.

Los efectos de la temperatura durante la incubación enzimática son muy acusados, pues temperaturas superiores a 36°C tienen un marcado efecto dañino sobre la formación de paredes y división posterior del protoplasto. Nosotros aislamos los protoplastos a 25°C, temperatura que no afectó en nada al posterior comportamiento de los mismos. Cuando el aislamiento se realizó a 33°C, la digestión enzimática redujo su duración aunque disminuyó ligeramente la cantidad de protoplastos intactos.

Igualmente importante para el aislamiento de protoplastos fue la edad de la planta y la posición que ocupan las hojas utilizadas en la producción de protoplastos. Nosotros hemos utilizado plantas de 60 a 90 días

para trabajar con alhelí y tabaco, así como plantas de habas de 30 días. En todos los casos, las hojas no estaban completamente extendidas y se hallaban en 7ª u 8ª posición desde el ápice.

En la literatura encontramos que Takebe y col. (1968) utilizan hojas totalmente extendidas de 60 a 80 días. Por el contrario, Schaskolskaya y col (1973) considera que las plantas óptimas a emplear son aquellas que tienen de 7 a 8 días, no superando jamás los 20 días. Coutts y Cocking (1972) sugieren que las mejores hojas para la obtención de protoplastos se encuentran en posición 4ª ó 5ª a partir del ápice.

En nuestro trabajo, hojas con las características indicadas nos han proporcionado los protoplastos más estables y susceptibles a una posterior infección viral.

1.2. Sobre el cultivo de protoplastos

Estos cultivos han sido encaminados a su posterior infección por virus, empleando diversos medios ya descritos.

En el cultivo de protoplastos, la presión osmótica es de gran importancia para el rendimiento en la

división y desarrollo de protoplastos (Wallin y Eriksson, 1973). Nosotros hemos observado que concentraciones de manitol superiores al 13 % (0,7 M) inhiben el crecimiento de los protoplastos volviendolos parduzcos.

Los protoplastos de diversas especies vegetales, incubados en medios de cultivo líquidos, reaccionaron de forma diferente:

En el medio B-5, protoplastos de *Vicia faba* resintetizaron su pared celular, observándose la primera división a las 30 horas.

Esta división ocurre de forma que el protoplasto se separa en dos partes iguales o desiguales, en cuyo caso, la mas pequeña es muy densa mientras que la mayor posee escaso citoplasma. Este tipo de división no ha sido descrito hasta el momento, si bien Gosch y col. (1975) señalan la existencia de protoplastos densos, recién aislados, debido a un exceso de antocianina.

La división no ocurre de forma sincrónica en todos los protoplastos, pues los hay que no se dividen hasta el tercer o cuarto día de cultivo. Normalmente, no sufren repetidas divisiones de forma que a los 4 días de cultivo podemos observar una población de células pequeñas y densas junto a otra formada por células claras de mayor tamaño. Para el crecimiento continuo de un cultivo de proto-

plastos en el medio B-5, resulta necesaria la adición periódica de nutrientes frescos (Kao y col. 1971).

Con escasa frecuencia, hemos observado (en protoplastos de *Vicia faba*) un crecimiento celular que consiste en la formación regular de yemas, dando una estructura de aspecto "cenocítico" muy semejantes a las descritas por Gosch y col. (1975) con protoplastos de *Daucus carota*.

La temperatura a que fueron cultivados estos protoplastos fue de 25°C, lograndose dividir en estas condiciones, aunque para Zapata y col. (1977) la división de protoplastos de hojas de tomate está condicionada a temperaturas superiores a los 25°C.

Ocasionalmente hemos observado en este medio la fusión espontanea entre protoplastos de habas que han sido aislados por un tratamiento prolongado con Drieselasa, Celulasa Onozuka y Macerozima R-10. Ya Reinert y Hellmann (1971-1973) señalaron la existencia de protoplastos polinucleados en preparaciones de *Daucus carota* (zanahoria) y Grambow y col. (1972) indicaron que se trataba de una fusión entre los mismos, ya que sus membranas se pueden fusionar siempre que estén en íntimo contacto (Poste y Allison, 1973).

Por otro lado, un preparado comercial de enzimas crudas puede contener un número variable de enzimas degradativas de la pared celular (Karr y Albersheim, 1970),

concretamente ha sido puesto de manifiesto el efecto de la "Drieselasa" sobre la fusión de protoplastos (Kao y col. 1974) que al dañar las membranas celulares facilita la fusión (Constabel y Kao, 1974).

En el medio de Prat y Poirier-Hamon fueron cultivados protoplastos de *Matthiola annua* (alhelí) donde tuvo lugar su primera división a las 20 horas , habiéndose sintetizado previamente una nueva pared celular. Este medio ha resultado ser muy bueno para las divisiones sucesivas de protoplastos que han podido realizarse incluso a 4°C y en la oscuridad.

Deducimos que la temperatura no es un factor decisivo para la división celular, como tampoco lo es la luz, pues apenas hay un ligero retraso en la división de protoplastos mantenidos a 4°C y en la oscuridad con respecto a los cultivados a 20-25°C con luz solar. Esto está en contra de los resultados de Bhojwani y col. (1977) cuyos protoplastos de algodón requieren temperaturas relativamente elevadas para dividirse, así como de Zapata y col. (1977) con protoplastos de tomate.

En cuanto a la luz como factor decisivo en el cultivo y división de protoplastos existe discrepancia entre los distintos autores, ya que para algunos parece ser necesaria en la división celular (Takebe y Nagata, 1973)

y la captura de aminoácidos del medio externo (Francki y col. 1971), mientras que Bhojwani y col. (1977) consideran que la oscuridad es un factor esencial para que los protoplastos puedan iniciar su división.

Esta posibilidad de división que exhibe un reducido número de protoplastos cultivados en el medio de Prat, a 0°C y en la oscuridad, la hemos interpretado suponiendo que estos protoplastos pudieron ser liberados de células que ya habían comenzado su ciclo de división. También puede ser atribuida al hecho de que este medio contiene una elevada cantidad de iones amonio (800 mg/l de nitrato amónico) que según Meyer y Abel (1975) estimulan la formación de paredes celulares, y 2,4-Diclorofenoxiacético que regula la división celular (Gamborg y col. 1968).

Se han observado varios tipos de división, como la bipartición, gemación y ambos a la vez. Después de 4 días de cultivo, empezaron a aparecer masas de células semejantes a embrioides. La división celular en estos embrioides no es completa, pudiéndose apreciar que los tabiques formados no separan totalmente las células, quedando el embriode reducido a un sincitio celular, semejante a los obtenidos por Grambow y col. (1972) con protoplastos de zanahoria en el medio B-5.

En el medio de Aoki y Takebe, ningún protoplasto fue capaz de dividirse pero algunos llegaron a regenerar una nueva pared a los 4 ó 5 días de cultivo, como lo demuestra el hecho de que no fueran plasmolizados al suspenderlos en tampón fosfato o agua destilada. Al cabo de este tiempo los protoplastos se mantienen esféricos pero van haciendose cada vez más densos. Esto se interpreta considerando que la nueva pared sintetizada los hace aparecer mas compactos y oscuros al microscopio óptico.

1.3. Observaciones por microscopía electrónica de protoplas tos sanos

La obtención de cortes ultrafinos nos ha permitido observar protoplastos completos que han perdido totalmente su pared celular, hallandose rodeados tan sólo por la membrana plasmática.

Las mejores micrografías han sido obtenidas, siguiendo las técnicas de Otsuki y col. (1972) con algunas modificaciones ya indicadas. El método de Gigot y col. (1972-1975), que incluye en agar los protoplastos antes de la fijación, también nos ha dado buenos resultados.

Al microscopio electrónico los protoplastos aparecen esféricos con una banda de citoplasma, alrededor de la membrana, donde se hallan el núcleo, cloroplastos y demás orgánulos; el interior aparece ocupado por una gran vacuola.

Los orgánulos celulares no sufren grandes alteraciones, si se exceptúan los cloroplastos que adquieren una gran capacidad metabólica, siendo capaces de dividirse y llegan a englobar mitocondrias.

Willison (1973) descubrió, en protoplastos de frutos de tomate, una división de los cloroplastos, semejante a los subcloroplastos observados por Gigot y col. (1975), quien también advierte la existencia de densos cuerpos amorfos en el estroma así como pequeñas vacuolas próximas a los bordes del cloroplasto, lo cual suele aparecer en cultivos celulares de plantas superiores (Sjolund y Weier, 1971), no haciendo mención a la captura de mitocondrias observada en nuestro trabajo. En cambio, nosotros no hemos observado unas series de pseudocristales que suelen presentar los cloroplastos de protoplastos aislados (Milne, 1972 ; Nagata y Yamaki, 1973 ; Gigot y col, 1975). Según Murakami (1972), estos cristales pueden ser inducidos por plasmolisis y están compuestos por una proteína, la carboxidismutasa.

En protoplastos sanos de *Vicia faba*, var.

"Aguadulce", hemos observado un fenómeno no mencionado por ningún autor hasta el momento. Se trata de la formación de masas citoplasmicas muy densas a los electrones que se van separando hasta quedar en la vacuola. Estas masas, de aspecto bastante uniforme, empiezan a formarse a partir del citoplasma próximo a los cloroplastos o a la membrana plasmática, haciendose gradualmente mas osmiófilas por degeneración de la materia viva.

Esta alteración del citoplasma puede ser debida al paso de la forma celular a protoplasto que según Gosch y col. (1975) activa la capacidad morfogenética. Dicha hipótesis se apoya en el hecho de que sólo hemos apreciado estas formaciones citoplasmicas en protoplastos de habas, siendo estas plantas las más jóvenes de nuestras experiencias y por tanto, aun conservan su totipotencia pudiendose dediferenciar mas facilmente hacia células meristemáticas.

1.4. Infección de protoplastos por virus

Hemos logrado la infección de distintas especies de protoplastos, con los tres virus que han sido objeto de nuestro trabajo, siguiendo las directrices de Otsuki y Takebe (1973-1976) y de Shalla y Petersen (1973) con las

variantes ya indicadas.

En el aislamiento de protoplastos que van a ser inoculados, hemos lavado siempre las hojas con agua destilada esteril tras su desinfección puesto que el hipoclorito sódico o la cloramina T pueden tener un efecto inhibitorio de la estabilidad del protoplasto (Power, 1971). Así mismo, todos los lavados de los protoplastos obtenidos se han realizado siempre en un medio que contenga Cl_2Ca ya que resulta indispensable para la estabilidad del protoplasto. Pelcher y col. (1974) han demostrado que los iones Ca^{2-} también aumentan la capacidad para regenerar paredes y activan la división de protoplastos de *Phaseolus vulgaris* (judía).

Hemos llevado a cabo, por primera vez, la infección de protoplastos de plantas superiores por dos miembros del grupo de los Potyvirus, el mayor grupo conocido de virus de plantas relacionados serológicamente y con una similar morfología (Brandes y Bercks, 1965). Este tipo de virus, formado por partículas largas y flexuosas de 700 a 800 nm, presenta problemas en su estudio por la tendencia a agregarse que poseen, lo cual dificulta extraordinariamente su aislamiento. Esta debe ser la causa de que aun no se haya realizado la infección de protoplastos con algun virus de este extenso grupo.

Se sabe que la frecuencia de infección de los protoplastos depende de la concentración de virus usada en la inoculación, habiéndose comprobado que para el virus del mosaico del tabaco (TMV), del mosaico del pepino (CMV) y el virus X de la patata (PVX), el número de células que van a ser infectadas es proporcional al logaritmo de la concentración del virus, dentro de cierto margen (Takebe, 1975).

Nosotros hemos necesitado una concentración de 15 ug de virus del mosaico del nabo (TuMV) para infectar un 60 % de los protoplastos de alhelí y 12,5 ug del virus del mosaico amarillo de la judía (BYMV)/ml para que un 35% de protoplastos de habas resultaran infectados. En ambos casos, para conseguir la infección ha sido necesaria la presencia de altas concentraciones (3 ug/ml) de poliornitina.

Se había observado que la poliornitina (PLO) resultaba imprescindible para la infección de protoplastos por TMV (Takebe y Otsuki, 1969), CMV (Otsuki y Takebe, 1973) PVX (Otsuki y col. 1974), CCMV (Motoyoshi y col. 1973) y AMV (Motoyoshi y col. 1975), pero no es esencial para infectar protoplastos con PEMV (Motoyoshi y Hull, 1974) y BMV (Motoyochi y col. 1974).

El efecto de la PLO parece depender de su estructura de "policación" capaz de neutralizar las cargas negativas de las partículas virales. Esto facilitaría su

adsorción sobre la superficie de los protoplastos que también están cargados negativamente (Grout y col. 1972), conociéndose desde hace tiempo la acción de poliaminoácidos básicos (incluida la PLO) sobre células animales incrementando la captura de proteínas (Ryser, 1968) y gránulos de almidón (Katchalski y col. 1964).

Takebe (1975) explica el mecanismo de la entrada de virus como una adsorción de las partículas virales sobre la superficie del protoplasto, posiblemente en la forma del "complejo virus-PLO", provocando un fenómeno similar a la endocitosis. Por su parte, Burgess y col. (1973a-1973b) observaron que la PLO causaba lesiones en la membrana facilitando la penetración del virus, hecho que ha sido confirmado recientemente por Kassanis y col. (1977) mediante el microscopio de scanning habiendo apreciado heridas en el plasmalema causadas por los agregados de TMV-PLO.

Por nuestra parte nada podemos añadir a estas conclusiones puesto que no hemos observado lesiones en la membrana ni tampoco procesos de endocitosis. Tan sólo en la infección de protoplastos con el virus esférico hemos observado partículas muy próximas al plasmalema que han podido introducirse en el citoplasma por cualquiera de los dos procesos.

Intentando establecer un paralelo con otras experiencias, hemos observado que las cantidades de inóculo y poliornitina necesarias para la infección de protoplastos por un virus de tipo Y , son algo similares a las utilizadas para infectar protoplastos por el "virus X de la patata", un virus de simetría helicoidal largo y flexuoso (Shalla y Petersen, 1973 ; Otsuki y col. 1974), si bien nosotros hemos necesitado mayores tiempos de incubación y preincubación.

La inoculación de protoplastos con el virus esférico que hemos estudiado, ha requerido solamente 3 ug/ml para infectar un 28 % de protoplastos de tabaco y una concentración de PLO de 1,5 ug/ml. Ambos valores son notablemente inferiores a los necesitados para infectar protoplastos por cualquiera de los dos Potyvirus, estando más en concordancia con los utilizados por otros investigadores con el "virus del mosaico del pepino" (Otsuki y Takebe 1973; Koike y col. 1977).

En todos los casos nos ha dado buenos resultados para la infección, la utilización del tampón citrato, si bien se ha comprobado que ciertos virus producen una infección mas eficaz en presencia de tampón fosfato (Kubo y col. 1974; Barker y Harrison, 1973a).

La infección de protoplastos por un virus del

mosaico del nabo se realizó en tampón borato pH=8,2 , alcanzando en estas condiciones los mayores porcentajes de infectividad. La infección a pH alcalino es excepcional en protoplastos que suelen infectarse a pH=5-5,5. Recientemente se ha logrado con éxito la inoculación de protoplastos a pH=8 (Motoyoshi y Oshima, 1976-1977) y a pH=9 (Barker y Harrison, 1977b), habiéndose observado, también, que la infección por ciertos virus es relativamente insensible al pH (Kubo y col. 1974). Creemos que estas diferencias de comportamiento son debidas a la diferente distribución de cargas de cada virus a un pH determinado.

Inmediatamente antes de la inoculación de protoplastos, los hemos resuspendido en una solución fresca de manitol que los hace más susceptibles a la infección (Otsuki y col. 1972); es posible que esto sea debido a la excreción de alguna sustancia inhibitoria de la infección.

En todos los casos hemos comprobado la infección de los protoplastos mediante ensayos de infectividad sobre plantas testigo que producen lesiones locales. El número de lesiones nos ha servido de referencia para estudiar el proceso de la replicación viral (Hibi y col. 1975), que en el caso de los virus del grupo Y (TuMV y BYMV) ha comenzado con un crecimiento casi lineal para estabilizarse a las 40-50 horas de cultivo. Ayudados por los resultados obtenidos con el microscopio electrónico, hemos inter-

pretado este crecimiento considerando que tras la penetración del virus, éste se multiplica activamente llegando un momento en que el protoplasto desvía su metabolismo hacia la producción de inclusiones virales (muy abundantes a las 48 horas de la inoculación), con lo que disminuye apreciablemente la velocidad de replicación del virus.

En el caso del virus esférico estudiado, el número de lesiones producidas frente al tiempo que los protoplastos han sido cultivados, nos representa una curva de tipo exponencial muy semejante a las observadas para el virus del mosaico del pepino (Kioke y col. 1977).

En ocasiones hemos observado una infectividad aparente a tiempo cero de inoculación, siendo debida a la existencia de virus que ha quedado adsorbido al protoplasto y no ha sido tomada en cuenta.

1.5. Microscopía electrónica de protoplastos infectados

Mediante la obtención de cortes ultrafinos hemos realizado un estudio de las alteraciones producidas en los protoplastos que han sido inoculados por un purificado de virus y llevaban 48-70 horas en cultivo. Las técnicas

utilizadas fueron las mismas que con protoplastos sanos, habiendose apreciado un mayor porcentaje de protoplastos dañados o rotos cuando se hallaban infectados por virus. Este hecho ha sido atribuido a una pérdida de estabilidad en los mismos al tener que soportar la replicación viral en su interior.

En general, hemos observado que la distribución de las partículas de virus en protoplastos es bastante semejante a la de las células que estan formando tejidos, si exceptuamos los resultados obtenidos con nuestro virus esférico, probablemente una nueva raza del "virus del mosaico del pepino".

En protoplastos infectados por cualquiera de los dos virus del grupo Y de la patata, hemos observado las inclusiones típicas que forman estos virus en tejidos foliares como son: inclusiones densas mas o menos extensas (Edwardson y col. 1968; Christie y col. 1968), anillos gruesos (Purcifull y col. 1973; Zitter y Cook, 1973) y remolinos o rosetas (Edwardson y Purcifull, 1970).

En protoplastos infectados por TuMV nunca hemos observado partículas de virus y en cambio aparecen gran cantidad de inclusiones virales distribuidas al azar por el citoplasma.

En protoplastos de habas inoculados con BYMV, aparte de las inclusiones formando bandas densas, muy frecuentes en hojas infectadas por este virus (Weintraub y Ragetli, 1966), hemos podido observar unas masas fibrilares compuestas por largos y flexuosos filamentos correspondientes a partículas de virus. Este virus se presenta asociado a una proteína que forma cristales muy densos constituidos por la unión de subunidades esféricas, tal como se ha descrito en tejidos enfermos (Rubio-Huertos, 1968).

El hecho mas destacado que hemos observado en estos protoplastos infectados ha sido la formación de masas citoplásmicas, semejantes a las descritas por nosotros en protoplastos sanos, pero aquí aparecen envolviendo a unos túbulos rectos, posiblemente inclusiones virales. Estas estructuras no han sido observadas con anterioridad en tejidos ni en protoplastos, y parece como si la célula reaccionara frente a la invasión de proteínas extrañas expulsándolas de su protoplasma vivo y lanzándolas hacia la vacuola central donde se presentan los citados túbulos rodeados por masas osmiófilas de citoplasma.

La infección de protoplastos con el virus esférico estudiado (nueva raza del "virus del mosaico del pepino", CMV), nos ha permitido conocer la distribución de las partículas virales que, contrariamente a lo que ocurre en tejidos infectados, aquí se localizan en el citoplasma y

nunca en los núcleos. Aparecen partículas aisladas, muy próximas a la membrana, observandose también grupos de partículas dispersos por el citoplasma o localizados en las vacuolas donde toman un aspecto cristalino.

Al parecer, nuestro virus esférico no es el único que presenta una ultraestructura diferente en protoplastos y tejidos infectados puesto que también se ha descrito una extraña acumulación del virus del mosaico del pepino (CMV) en protoplastos inoculados (Honda y col. 1974) en contraste con la distribución aleatoria de este virus en tejidos foliares (Misawa y Ehara, 1966; Honda y Matsui, 1974).

Curiosamente, los protoplastos infectados por CMV (Otsuki y Takebe, 1973-1976), tras penetrar por un fenómeno similar a la pinocitosis, presentan una distribución del virus en su citoplasma muy similar a la que nosotros hemos observado con el virus esférico. Aparte de esta localización citoplasmica, también se ha descrito la existencia de partículas y agregados de CMV en los núcleos de protoplastos (Otsuki y Takebe, 1973; Koike y col. 1977), hasta el punto de que Honda y col. (1974) sugieren que estas partículas son producidas en el núcleo.

2. ESTUDIO PARTICULAR DE LOS VIRUS EMPLEADOS

2.1. Virus del mosaico del nabo (Turnip mosaic virus, TuMV)

El virus que fue encontrado en plantas enfermas de alhelí, rápidamente fue identificado como el "virus del mosaico del nabo", Brassica virus 1, por su sintomatología sobre plantas de ensayo, concretamente en Crucíferas, así como por sus típicas inclusiones visibles al microscopio óptico y al electrónico.

Este virus, descrito por Schultz (1921), se halla incluido en el grupo de los Potyvirus junto con casi 100 virus aparentemente diferentes (Edwardson, 1974), que no han sido caracterizados con detalle y muchos se han clasificado según su morfología y propiedades biológicas, llegando a estar considerado como el mayor grupo de virus de plantas definido (Harrison y col. 1971; Shepherd y col. 1976).

Plantas de Brassica napus inoculadas mecánicamente con este virus produjeron unos anillos necróticos muy marcados lo que nos hizo suponer que estábamos trabajando con la variedad denominada "virus del anillo necrótico de la col" (Cabbage black ringspot virus), hecho comprobado más tarde por la ultraestructura que presenta al mi-

croscopio electrónico.

El virus esta formado por partículas flexuosas y su longitud ha sido medida , resultando estar comprendida entre 700-800 nm. Para este virus se han descrito longitudes máximas de 754nm y mínimas de 680 nm (Shepherd y Pound, 1960).

En tinción negativa de savia hemos observado dos tipos de inclusiones, una de éllas corresponde a los "agregados laminares" en forma de rectángulos o triángulos descritos por Edwardson y Purcifull (1970), mientras que el otro tipo de inclusión está formado por partículas de virus ordenadas paralelamente que podrían corresponderse con las estructuras en forma de forma de peine o cepillo observadas en cortes ultrafinos.

El aislamiento de este virus, en cantidad suficiente y con la pureza adecuada para obtener una posterior información sobre su composición química, nos resultó difícil hasta la utilización del método de Moghal y Franki(1976) que nos produjo muy buenos rendimientos cuali y cuantitativamente.

La dificultad con este virus, y todos los de su grupo, estriba en su tendencia a la agregación extremo con extremo y de tipo lateral en el curso de su purifica-

ción, rindiendo un producto final de escasa calidad (Hill y Shepherd, 1972). El descubrimiento por Shepherd y Puond (1960) de que el TuMV no formaba agregados en tampón borato (pero si en el fosfato) ha sido la base para utilizar métodos de aislamiento evitando la agregación, y por tanto elevando considerablemente los rendimientos.

El espectro de absorción con luz ultravioleta nos confirmó la pureza alcanzada en el aislamiento del virus, indicándonos el radio de absorción a 260/280 un escaso contenido en ácido nucleico, concordando con las investigaciones realizadas con otros virus del grupo Y de la patata (Damirdagh y Shepherd, 1970; Stace-Smith y Tremaine, 1970).

La proteína de la cápside de este virus, migró como un componente simple en gel de poliacrilamida, resultando tener un peso molecular de 35.000 daltons, valor que coincide con los obtenidos para otros Potyvirus (Hill y col. 1972 ; Brunt y Kenton, 1972). Hiebert y McDonald (1973) utilizando el mismo sistema de geles de poliacrilamida han obtenido dos componentes para la proteína viral, uno de ellos (lento) coincide con el obtenido por nosotros, habiendose determinado un peso molecular de 27.000 para el componente rápido. Por su parte, Hill y Shepherd (1972) sólo obtienen en sus investigaciones sobre TuMV, el polipeptido mas pequeño.

El estudio de los tejidos infectados por TuMV nos ha permitido observar largas y densas inclusiones junto con partículas de virus en zonas de citoplasma con abundantes ribosomas. Estas estructuras coinciden con las descritas por Kamei y col. (1969) para este virus y al ser cortadas perpendicularmente presentan el aspecto de anillos excentricos o bucles (Weathers, 1972). No nos ha sido posible llegar a conocer la estructura interna de estas bandas, aunque podrían estar formadas por paquetes de partículas virales que al estar fuertemente comprimidas las hace aparecer muy densas al microscopio electrónico.

También hemos encontrado unas inclusiones en forma de peine o cepillo constituidas por masas de partículas de virus en disposición paralela que por un extremo se unen a las densas inclusiones y por el otro a un sistema de doble membrana. Dichas estructuras coinciden con las descritas por Hayashi y col. (1965) para este virus, siendo tambien idénticas a las encontradas por Rubio-Huertos y Vela Cornejo (1966) en plantas enfermas de *Amaranthus*. Cuando estas inclusiones son cortadas transversalmente, dan lugar a haces desiguales de partículas que presentan un aspecto casi cristalino, sin que exista membrana alguna que los rodee.

Así mismo hemos observado masas fibrilares compuestas por partículas de virus que fijan uno de sus

extremos a una membrana. En hojas que presentaban anillos necróticos hemos encontrado unas inclusiones formando placas con cierta orientación longitudinal (parecidas a las observadas en tinción negativa), uno de cuyos extremos también se apoya sobre una doble membrana.

En varias ocasiones hemos mencionado la existencia de dobles membranas asociadas a la infección por este virus, siendo semejantes a las encontradas por Rubio Huertos y Vela Cornejo (1966) en células de *Amaranthus*, pero no descritas para TuMV. Por el momento, el origen de estas dobles membranas es desconocido, pues, si bien pueden pertenecer al retículo endoplasmico, nunca se observan en el citoplasma de células sanas, lo que nos hace suponer que han sido inducidas por la presencia del virus.

También en zonas necróticas observamos unas estructuras complejas, en las que aparece una banda gruesa de donde parecen derivar otras mas delgadas y flexuosas formando anillos o remolinos, todo ello asociado con partículas de virus paralelas entre sí. Este tipo de inclusión compleja no ha sido descrita hasta el momento y se localizan muy próximas al núcleo, teniendo una matriz formada por citoplasma con abundantes ribosomas y retículo endoplásmico. Esto nos indica que aquí debe tener lugar una intensa síntesis proteica, lo cual, unido al hecho de que estan presentes casi todos los tipos de inclusión que pro-

duce este virus, nos ha llevado a la conclusión de que podría tratarse del lugar de síntesis del virus así como de las inclusiones por él inducidas. Según Bald (1966) existen evidencias de que los ribosomas son necesarios para el ensamblaje entre la proteína y el RNA de un virus, reuniéndose en nuestro caso, muchas condiciones favorables para que dicha síntesis tenga lugar.

La infección de protoplastos por este virus, sólo ha producido bandas densas, anillos gruesos y remolinos o rosetas a las 48 horas de cultivo. Pensamos por tanto, que estas estructuras son las primeras en formarse tras la replicación del virus que sigue un crecimiento lineal muy rápido hasta que se estabiliza a las 50-60 horas. Estas afirmaciones están de acuerdo con las experiencias de Shalla y Petersen (1973) al infectar protoplastos con PVX y que sólo han podido observar los "cuerpos de inclusión" de este virus después de que se han acumulado grandes cantidades de partículas virales en el citoplasma.

2.2. Virus del mosaico amarillo de la judía (Bean yellow
mosaic virus, BYMV)

El estudio histológico de la muestra de virus encontrada en plantas de haba enfermas, nos permitió reconocer al "virus del mosaico amarillo de la judía", Phaseolus virus 2.

Este virus, descrito por Pierce (1934) es muy semejante al del "mosaico común de la judía" (Phaseolus virus 1), diferenciándose de él en que produce, en células de Vicia faba infectadas, unas inclusiones amorfas granulares fácilmente detectables al microscopio de luz (Rubio Huertos, 1950). Actualmente, se halla incluido en el grupo de los Potyvirus (Edwardson, 1974), siendo el virus de leguminosas mas extendido en todas las regiones españolas, exceptuando Andalucía (Rubio-Huertos y col. 1967). Está formado por partículas alargadas y flexuosas cuya longitud principal hemos determinado y está comprendida entre 700 y 800 nm, respondiendo a la estructura descrita por Varma y col. 1968).

Presenta dificultades para su aislamiento debido principalmente a tres causas:

- 1º) Las partículas virales se agregan y aglutinan con los cloroplastos, de forma que se pierden

al centrifugar la savia.

2º) Son partículas lábiles que pueden destruirse con ciretos disolventes orgánicos.

3º) Las preparaciones suelen estar contaminadas con proteínas normales de la planta.

Por microscopía electrónica pudimos comprobar que el Método utilizado había dado buenos resultados, observando abundantes partículas libres de contaminantes y sin sufrir agregación.

La pureza del virus fue confirmada por espectrofotometría, obteniendo un máximo de absorción a 260 nm y un mínimo a 240 nm, junto a una relación de absorbancia 260/280 que nos expresa un bajo porcentaje de RNA en la partícula (Damirdagh y Shepherd, 1970; Stace-Smiht y Tremaine, 1970).

Mediante electroforesis en geles de poliacrilamida, separamos la proteína de la cápside viral en dos componentes. La determinación de sus pesos moleculares nos dió valores de 209.500 daltons para la proteína rápida y 262.600 daltons para la lenta.

Estos valores son seis veces superiores a los calculados por otros autores para este virus o los de su

grupo, lo que nos inclina a pensar que existen fuertes atracciones electrostáticas, de Van der Waalls y puentes de hidrógeno entre los seis monómeros constituyentes de cada capsómero, y que no se han llegado a romper al disociar las proteínas. Estos agregados estarían formados por subunidades de 35.000 y 43.700 daltons respectivamente. La subunidad más pequeña tiene entonces un peso molecular similar al calculado por otros autores para este virus (Uyemoto y col. 1972; Huttinga, 1975; Moghal y Francki, 1976), mediante geles de poliacrilamida conteniendo SDS.

Hiebert y McDonald (1973) encuentran, igual que nosotros, un componente rápido y otro lento, atribuyendo el peso molecular más alto a diferencias en el tamaño, forma o carga. También se han calculado pesos moleculares muy bajos (del orden de 27.000 daltons) para la cubierta proteica de otros virus del grupo Y (Hill y Shepherd, 1972 Hill y col. 1973), que podrían explicarse por una parcial degradación de la proteína viral "in vitro".

A la vista de la heterogeneidad en los resultados obtenidos por distintos investigadores y nosotros mismos, creemos que todos estos datos representan otro ejemplo de resultados erróneos, con el sistema de electroforesis poliacrilamida-SDS, semejante al descrito para las proteínas virales del Grupo X de la patata (Koenig, 1972).

En secciones ultrafinas se han descrito tres tipos de formaciones intracitoplásmicas para este virus , (Weintraub y Ragetli, 1966-1968; Kamei y col. 1969), que son las siguientes:

- Pequeñas masas fibrosas de partículas sueltas
- Bandas densas a los electrones
- Cuerpos densos o cristales

Nosotros, en los estudios histológicos realizados al microscopio electrónico, hemos podido ver estas mismas estructuras, junto con unas alteraciones de los cloplastos que desorganizan su sistema de membranas, destruyendo la estructura típica del cloroplasto, que suelen presentar pequeñas gotas de material lipídico en su interior. La acumulación de material lipídico puede ser una respuesta a la infección por virus, pero no específica. Greenwood y col. (1963) observan, en plantas sanas de Vicia faba, glóbulos de grasa tanto mas abundantes cuanto más viejas son las hojas.

Tambien hemos observado múltiples membranas concéntricas de aspecto mielínico, semejantes a las que aparecen en la infección por CMV (Gerola y col. 1965) pero que no han sido asociadas con el virus del mosaico amarillo de la judía (BYMV). Los nucleolos presentan una morfología típica, apareciendo divididos en dos partes, una

de éllas muy densa y que no se corresponde con las inclusiones amorfas intranucleolares descritas para este virus (Díaz Ruiz, 1971), siendo más bien la parte granular del nucleolo que se presenta muy patente en células infectadas.

La infección de protoplastos por este virus, ha reproducido los tres tipos de formaciones ya descritas para el BYMV, pero ninguna de las otras alteraciones que hemos observado en los cloroplastos o el nucleolo de tejidos infectados.

Tampoco aparecen estructuras membranosas mielínicas, pero sin embargo, es muy frecuente encontrar en protoplastos infectados, grandes masas de citoplasma muy oscuras rodeando a unos tubos, posiblemente trozos de inclusiones virales, que la célula va envolviendo y lanzando hacia la vacuola. Ninguna estructura semejante a éstas han sido descritas hasta el momento, pudiéndose tratar de una respuesta del protoplasto frente a la infección.

Creemos que los trabajos realizados con este virus, tienen interés en lo que concierne a la ecología y epidemiología de un virus tan extendido como éste y que afecta a tan variados cultivos de leguminosas.

2.3. Virus esférico (Del grupo de los Cucumovirus, CMV)

El virus encontrado en plantas enfermas de Spinacea oleracea en las provincias de Valencia y Madrid (Aranjuez), ha resultado ser un virus esférico relacionado con el grupo de los "Cucumovirus", pudiendose tratar de una nueva raza del "virus del mosaico del pepino" (CMV)

El tamaño de las partículas medidas es de 27 nm, a diferencia de los 30 nm de diámetro descritos para el CMV.

En tinciones negativas, con P.T.A., de preparaciones purificadas, hemos observado estas partículas con y sin fijación previa, no apreciandose diferencias entre los dos casos; no ocurre así con el CMV que requiere una fijación con formaldehído para mantener la integridad de las partículas (Francki y Habili, 1972). Así mismo, nuestro virus ha resultado ser mucho mas estable que el del mosaico del pepino al tener una longevidad "in vitro" de 15 dias a 42C (Gibbs y Harrison, 1973).

Su espectro de absorción con luz ultravioleta nos ha demostrado la pureza alcanzada en el aislamiento y la relación de absorción a 260/280 nos indica un elevado

porcentaje de ácido nucleico en la molécula viral (18%), igual que se ha determinado para el CMV (Kaper y col. 1965).

El virus purificado reacciona serológicamente con los antisueros del virus del mosaico del pepino, dando una intensa línea de reacción. También la electroforesis en gel de poliacrilamida del ácido nucleico viral revela cuatro RNAs, característica típica del grupo de los Cucumovirus (Kaper y West, 1972).

Las mayores diferencias se encuentran en la ultraestructura de células infectadas que presentan los núcleos invadidos por partículas de virus que inicialmente aparecen aisladas y se van reuniendo en grupos conforme avanza la infección. Estas partículas del núcleo tienen un aspecto diferente a las descritas, también en los núcleos, para el CMV (Honda y Matsui, 1974).

El virus estudiado por nosotros no forma cristales en el citoplasma ni va acompañado de un incremento de estructuras membranosas ni desorganización celular, como describen Gerola y col. (1965) para la raza Y del CMV. Tampoco produce alteraciones en los granos de los cloroplastos ni agregaciones de los ribosomas, no habiéndose observado que produzca ningún tipo de inclusión (Honda y Matsui 1968). Por otro lado, ninguno de los autores anteriores

ha descrito unas masas de aspecto fibrilar, observadas por nosotros, en el nucleo y muy próximas al nucleolo.

Este virus esférico tiene características sin tomatológicas, morfológicas y fisico-químicas semejantes en muchos aspectos a las del CMV, pero resulta mucho mas estable y con una ultraestructura peculiar.

La localización de las partículas de virus en protoplastos infectados es exclusivamente citoplasmica. Suelen hallarse próximas a la membrana celular y en las va cuolas, disponiendose al azar por el citoplasma. A veces se reunen en agregados que llegan a formar estructuras casi cristalinas. Ocasionalmente los cloroplastos aparecen deshechos, siendo este hecho muy frecuente en la ultraestructura de tejidos infectados por CMV (Gerola y col. 1965 Misawa y Ehara, 1966).

La distribución de nuestro virus esférico en citoplasma de protoplastos infectados coincide, a grandes rasgos, con la descrita por otros autores para el CMV (Otsuki y Takebe, 1973; Honda y col 1974; Koike y col. 1977), aunque alguno de estos investigadores tambien han encontrado partículas de virus en los nucleos. Nosotros, nunca hemos observado estas partículas en el nucleo de protoplastos infectados, pero si en tejidos foliares de plantas inoculadas con este virus.

El porcentaje de protoplastos infectados, ha sido escaso en comparación con el que otros autores alcanzan para el CMV (Otsuki y Takebe, 1973; Koike y col. 1977), pudiendo ser debido a una pérdida de infectividad o mas bien al hecho de que sólo hemos considerado protoplastos "intactos" observados y precisamente los protoplastos infectados son mas inestables y frecuentemente se rompen durante el proceso previo a su observación al microscopio electrónico.

Por otra parte, una vez que estos virus esféricos logran penetrar en el protoplasto, se replican muy activamente en su interior como lo demuestra su curva de crecimiento exponencial (según ensayos de infectividad) y las micrografías conteniendo una gran descendencia de virus

La identificación de un virus como este resulta en extremo difícil, porque el CMV posee gran cantidad de razas con propiedades diferentes, ataca a gran número de plantas y los síntomas producidos son de gran variabilidad, no sólo entre las diferentes razas sino dependiendo tambien de factores ambientales. Bhargava (1951) ya puso de manifiesto esta variabilidad en un estudio comparativo entre cuatro estirpes de este virus.

Consideramos que por la sintomatología, morfo

logia y propiedades fisico-químicas que exhibe este virus esférico, especialmente el tener su genoma dividido en cuatro RNAs, nos permite introducirlo en el grupo de los Cucumovirus. Pero sus peculiares características como son: estabilidad ante el P.T.A. y una ultraestructura en tejidos diferente al CMV aunque semejante a él si se trata de protoplastos infectados, nos lleva a la conclusión de que hemos estado trabajando con una raza muy estable del "virus del mosaico del pepino" aún no descrita.

CAPITULO V. RESUMEN Y CONCLUSIONES

En este trabajo que constituye nuestra Tesis Doctoral, hemos alcanzado los objetivos previstos, es decir, analizar el comportamiento de ciertos virus en la célula vegetal y ver cómo ocurre su replicación en protoplastos aislados de plantas superiores, realizando un estudio comparativo de ambos procesos.

Para llevar a cabo este programa, comenzamos con la obtención y cultivo de protoplastos de tres especies vegetales diferentes (*Nicotiana tabacum*, *Matthiola annua* y *Vicia faba*), siendo la primera vez que se producen y cultivan protoplastos de estas dos últimas especies.

En todos los casos hemos logrado gran cantidad de protoplastos estables que han podido ser cultivados llegando a regenerar una nueva pared celular y a dividirse posteriormente. Entre los tipos de división que hemos observado (bipartición, gemación, escisión...etc) destaca la de protoplastos de *Vicia faba*, var. "Aguadulce" en el medio B-5, donde aparecen dos células hijas totalmente

diferentes, una de ellas pequeña y muy densa mientras que la mayor está casi desprovista de citoplasma y ocupada por una gran vacuola. Este tipo de división no tiene paralelo en la bibliografía, siendo la forma de división más frecuente de los citados protoplastos.

También hemos comprobado que algunos protoplastos de *Matthiola annua* cultivados en el medio de Prat han podido dividirse a 4°C y en la oscuridad, contrariamente a lo que sucede con protoplastos de otras especies vegetales. Deducimos, por tanto, que la temperatura y la luz no son factores decisivos en la división de protoplastos, aunque la favorezcan considerablemente.

La observación de protoplastos al microscopio electrónico nos confirmó la imagen ya obtenida al óptico donde se presentan totalmente esféricos, con los cloroplastos situados en la periferia y una gran vacuola central. La ultraestructura de dichos protoplastos no presenta diferencias considerables respecto a la de cualquier célula vegetal que se halle formando parte de un tejido. Los orgánulos celulares poseen un aspecto normal exceptuando algunos cloroplastos que, manteniendo su morfología, se comportan como estructuras autónomas siendo capaces de capturar mitocondrias.

Un fenómeno extraño se produce en protoplastos sanos de *Vicia faba* no descrito por ningún autor hasta el momento. Consiste en la formación de densas masas citoplásmicas, bastante uniformes, que van siendo depositadas en la vacuola. Dichas masas, probablemente citoplasma degenerado, podrían ser formas de diferenciación o regresión hacia células meristemáticas, causadas por el paso de la forma celular a protoplasto.

Como paso previo a la infección de protoplastos, hemos aislado y caracterizado una serie de virus vegetales que nos han servido de inóculo para infectar los protoplastos donde poder observar la replicación viral y las alteraciones producidas, comparandolas con las que estos mismos virus producen en tejidos de plantas.

Los virus con que hemos trabajado, han sido siempre obtenidos a partir de plantas enfermas encontradas en el campo que presentaban síntomas evidentes de mosaico y deformaciones. Identificamos dos virus largos y flexuosos, componentes del grupo Y de la patata (*Virus del mosaico del nabo* y *Virus del mosaico amarillo de la judía*), así como un tercer virus esférico del grupo de los Cucumovirus (una nueva raza del *Virus del mosaico del pepino*) no descrito.

El estudio del Virus del mosaico del nabo (TuMV), nos ha permitido transmitirlo a diversas plantas de ensayo y observar la sintomatología producida. En plantas de Brassica napus desarrolló unos anillos necróticos típicos de la variedad denominada "virus del anillo necrótico de la col" (Cabbage black ringspot virus).

Este virus ha sido purificado con éxito y observado en tinción negativa donde aparecen largas partículas que han sido medidas, resultando una longitud comprendida entre 700 y 800 nm. Dichas partículas mantienen su individualidad no presentando agregación entre ellas.

El espectro de absorción de una suspensión purificada del virus nos dió una curva típica de nucleoproteínas, confirmandonos la pureza alcanzada en el aislamiento, al mismo tiempo que nos expresaba un escaso porcentaje de RNA en la partícula de virus.

La electroforesis de la proteína viral, en gel de poliacrilamida, resolvió un único componente cuyo peso molecular fue calculado y resultó ser de 35.000 daltons.

La ultraestructura de tejidos infectados por este virus nos ha permitido observar: inclusiones densas, anillos gruesos (que corresponden a las anteriores inclusiones al ser cortadas transversalmente) y remolinos o

rosetas. También hemos encontrado unas inclusiones en forma de peine o cepillo (que en sección tangencial parecen agregados cristalinos), así como amplias placas y masas fibrilares de partículas dispuestas en paralelo.

Aunque todas estas estructuras ya han sido observadas en la infección por este virus, no se han descrito una serie de dobles membranas que nosotros hemos hallado intimamente relacionadas con las inclusiones virales y que no pertenecen al retículo endoplasmico, sino que han debido ser inducidas por la presencia del virus. Tampoco se ha mencionado con anterioridad unas "inclusiones complejas", próximas al núcleo, cuya matriz posee abundantes ribosomas y donde se hallan presentes casi todos los tipos de inclusión que produce este virus, pudiendose tratar del lugar de síntesis de las mismas.

En protoplastos de *Matthiola annua* (alhelí) infectados por el TuMV, hemos observado las mismas imágenes que en los tejidos foliares de esta planta, es decir, inclusiones densas mas o menos extensas, anillos gruesos y remolinos o rosetas, todas ellas en gran cantidad.

No hemos encontrado, sin embargo, las inclusiones que este virus produce en hojas de *Brassica napus* (masas fibrilares, inclusiones en peine o cepillo y las complejas estructuras próximas al núcleo), demostrandonos

así, que la citología de protoplastos infectados es específica pues se corresponde con la exhibida por células de su misma especie que estan formando tejidos, pero no reproduce estructuras que este mismo virus es capaz de provocar en otras especies vegetales.

La replicación del virus en el interior de dichos protoplastos sigue un desarrollo muy rápido, casi lineal, durante las primeras horas que siguen a la infección para estabilizarse a las 50-60 horas.

Las investigaciones llevadas a cabo con el Virus del mosaico amarillo de la judía (BYMV), nos han permitido conocer la sintomatología que produce en diversas plantas de ensayo y llevar a buen fin la purificación del mismo evitando las múltiples dificultades que presenta por su labilidad y tendencia a la agregación.

Preparaciones purificadas fueron observadas en tinción negativa, procediendose a determinar su tamaño que esta comprendido entre 700 y 800 nm.

Por espectrofotometría comprobamos la pureza y el rendimiento alcanzados en el proceso de aislamiento, indicándonos además una escasa proporción de RNA en la partícula de virus.

La electroforesis en gel de poliacrilamida de la proteina viral resolvió dos componentes. La determinación de sus pesos moleculares nos dió valores de 209.500 daltons para la proteina rápida y 262.600 daltons para la lenta, resultados que son seis veces superiores a los calculados por otros autores para este virus. Creemos, por tanto, que hemos aislado los capsómeros de la cubierta viral, constituidos cada uno por seis subunidades (monómeros) fuertemente unidas por atracciones electrostáticas que nosotros no hemos llegado a romper.

En los estudios histológicos realizados al microscopio electrónico hemos observado los tres tipos de inclusiones típicas descritos para este virus como son: barras dendas de longitud variable, cristales de proteina y estructuras fibrilares.

Por nuestra parte, junto a estas inclusiones hemos observado una alteración de los cloroplastos que almacenan pequeñas gotas de grasa en su interior y desorganizan su sistema de membranas. También hemos apreciado estructuras membranosas mielínicas localizadas en las vacuolas, así como nucleolos divididos en sus dos porciones típicas que aparecen mucho mas patentes en células infectadas que sanas. Estas alteraciones citológicas no han sido asociadas con anterioridad a la infección por BYMV, aunque suelen ser producidas por otros virus.

La ultraestructura de protoplastos de Vicia faba (habas) infectados por este virus reprodujo los tres tipos de inclusiones ya descritos, pero ninguna de las otras alteraciones que nosotros hemos observado en los tejidos. Sin embargo, es muy frecuente encontrar unas estructuras formadas por "túbulos rectos" rodeados por masas de citoplasma muy osmiófilas (semejantes a las observadas por nosotros en protoplastos sanos) que van siendo abandonadas en la vacuola. Este fenómeno no ha sido observado con anterioridad, pudiendose tratar de una defensa del protoplasto frente a proteínas extrañas a las que envuelve y lanza a la vacuola.

Al igual que el anterior Potyvirus objeto de nuestro estudio, la replicación del BYMV en protoplastos ha seguido un crecimiento lineal hasta que se estabiliza a las 60-70 horas de la infección.

El estudio detallado del virus esférico encontrado en plantas enfermas de Spinacea oleracea (espinacas), nos ha permitido identificarlo como un miembro del grupo de los Cucumovirus (Virus del mosaico del pepino, CMV), pero sus peculiares características nos indican que se trata de una nueva raza muy estable, no descrita en la literatura.

Este virus ha sido transmitido a diversas plantas de ensayo, provocando síntomas similares a los del CMV.

La purificación del mismo nos ha permitido observar, en tinción negativa, pequeñas partículas esféricas de 27 nm de diametro. A diferencia de lo que ocurre con el CMV, nuestro virus esférico resiste la tinción con ácido fosfotungstico sin necesidad de fijación previa.

Tambien ha demostrado una mayor estabilidad que el CMV al tener una longevidad "in vitro" de 15 días, manteniendo su estructura e infectividad.

El espectro de absorción con luz ultravioleta nos confirmó la pureza y rendimiento alcanzados en el aislamiento, sirviendonos tambien para determinar el porcentaje de RNA en la partícula de virus que resultó ser del 18% (igual que para CMV).

Un purificado de este virus reaccionó intensamente con los antisueros de CMV y la electroforesis en gel de poliacrilamida del RNA viral, nos reveló la existencia de cuatro RNAs, característica típica del grupo de los Cucumovirus.

La ultraestructura de tejidos infectados por este virus no presenta alteraciones citoplasmicas de ningun tipo y sin embargo, los nucleos aparecen conteniendo un número variable de partículas esféricas que pueden presentarse aisladas o en grupos, intentando cristalizar. De forma ocasional hemos observado unas "estructuras fibrilares" localizadas en el nucleo y muy próximas al nucleolo.

El estudio, por microscopía electrónica, de protoplastos infectados nos indica que, contrariamente a lo que ocurre en los tejidos, el virus se localiza en el citoplasma y nunca en el núcleo. La distribución del virus en el interior de protoplastos es aleatoria, disponiendose en el citoplasma o en las vacuolas y pudiendose observar partículas aisladas o grupos de partículas que llegan a formar estructuras cristalinas, distribución que coincide, a grandes rasgos, con la del CMV en protoplastos y tejidos infectados.

El desarrollo de la multiplicación de nuestro virus esférico en protoplastos inoculados sigue un crecimiento exponencial, coincidente con el descrito para el CMV.

De todo lo expuesto deducimos que el virus esférico estudiado es un Cucumovirus muy estable y con pro-

iedades peculiares, tratandose por tanto de una nueva raza del Virus de mosaico del pepino no descrita hasta el momento.

CONCLUSIONES

Considerando los resultados obtenidos, hemos llegado a las siguientes conclusiones:

1º) Los protoplastos obtenidos de plantas superiores aparecen al microscopio óptico y al electrónico como esferas perfectas, con los cloroplastos próximos a la membrana plasmática y una gran vacuola en el centro.

2º) Su ultraestructura no presenta grandes diferencias con respecto a cualquier célula vegetal, exceptuando la formación de densas masa citoplasmicas que se van depositando en la vacuola, cuando los protoplastos proceden de plantas jóvenes.

3º) La luz y la temperatura no son factores esenciales en la división de protoplastos, puesto que ésta puede llevarse a cabo a 4°C y en la oscuridad.

42) La ultraestructura de tejidos infectados por el Virus del mosaico del nabo (TuMV) presenta tres tipos de inclusiones que se hallan íntimamente relacionados con sistemas de dobles membranas. Dichas membranas han sido inducidas por la presencia del virus puesto que son diferentes a las del retículo endoplásmico y nunca aparecen en células sanas.

52) La ultraestructura de tejidos infectados por el Virus del mosaico amarillo de la judía (BYMV), aparte de las típicas inclusiones virales, presenta una desorganización de los cloroplastos, un incremento en estructuras membranosas mielínicas y una cierta alteración de los nucleolos.

62) Hemos aislado y caracterizado una nueva raza del Virus del mosaico del pepino (CMV), formada por partículas isométricas de 27 nm muy estables, con su genoma dividido en cuatro RNAs y una ultraestructura peculiar.

72) Se ha realizado por primera vez la infección de protoplastos vegetales con dos miembros del grupo de los Potyvirus (TuMV y BYMV). Estos virus se han replicado dentro de los protoplastos y han sido capaces de formar inclusiones.

8º) Los protoplastos infectados por TuMV o BYMV mantienen su especificidad, pues reproducen la ultraestructura de células infectadas de su misma especie pero no la de especies vegetales diferentes.

9º) Los protoplastos infectados con BYMV reaccionan frente a la infección formando masas osmiófilas de citoplasma que rodean a ciertas inclusiones virales y las arrojan hacia la vacuola.

10º) La ultraestructura de protoplastos infectados con la nueva raza del CMV, es totalmente diferente a la que este virus presenta en tejidos de plantas enfermas.

CAPITULO VI. BIBLIOGRAFIA

1. AMELUNXEN, F. (1958). Darstellung elektronenmikroskopische und biochemische analyse del virus. Protoplasma 49, 140-178
2. AOKI, S. Y TAKEBE, I. (1969). Infection of tobacco mesophyll protoplasts by tobacco mosaic virus ribonucleic acid. Virology 39, 439-448
3. BALD, J.G. (1966). Cytology of plant virus infections. Adv. Virus Resch. 12, 103
4. BARKER, H. Y HARRISON, B.D. (1977a). The interaction between raspberry ringspot and tobacco ratle viruses in doubly infected protoplasts. J. Gen. Virol. 35, 135-148
5. BARKER, H. Y HARRISON, B.D. (1977b). Infection of tobacco mesophyll protoplasts with raspberry ringspot virus alone and together with tobacco ratle virus. J. Gen. Virol. 35, 125-133
6. BEIER, H. Y BRUENING, G. (1975). The use of an abrasive in the isolation of cowpea leaf protoplasts which support the multiplication of cowpea mosaic virus. Virology 64, 272-276
7. BEIER, H. Y BRUENING, G. (1976). Factors influencing the infection of cowpea protoplasts by cowpea mosaic virus-RNA. Virology 72, 363-369

8. BHARGABA, K.S. (1951). Some properties of four strains of cucumber mosaic virus. *Ann. Appl. Biol.* 38, 377
9. BOEDTKER, J. (1971). Conformation independent molecular weight determination of RNA by gel electrophoresis. *Biochem. Biophys. Acta* 240, 448
10. BODE, O. Y KOHLER, E. (1952). Elektronenmikroskopische untersuchungen am kartoffel-X-und tabakmosaikvirus *Z. Naturf.* 76, 598-600
11. BOS, L. Y RUBIO-HUERTOS, M. (1969). Light and electron microscopy of cytoplasmic and unusual nuclear inclusion bodies evoked by a virus from necrotic peas. *Virology* 37, 377
12. BOS, L. (1970). "Symptoms of Virus Diseases in Plants" Mededel. 307, Centre for Agricultural Publishing and Documentation, Wageningen (Netherlands).
13. BRAKKE, M.K. (1967). *Methods in virology*, Academic Press, vol. II p. 133
14. BRANDES, J. (1957). Eine elektronenmikroskopische schnell-methode zum nachweis faden und stabchenformige viren, insbesondere in kartoffeldunkelkeimlingen. *Nachricht. Dr. Pfalz. Braunschweig* 9, 151
15. BRANDES, J. Y WETTER, C. (1959). Classification of elongated plant viruses on the basis of particle morphology. *Virology* 8, 99-115

16. BRANDES, J. Y BERCKS, R. (1965). Gross morphology and serology as a basic for classification of elongated plant viruses. *Adv. Virus Res.* 11, 1-24
17. BRENNER, S. Y HORNE, R.W. (1959). Size and shape of the particles of potato virus S, potato virus M, and carnation latent virus. *Phytopathology* 49, 443
18. BRUNT, A.A. Y KENTON, R.H. (1972). Pepper veinal mottle virus - a new member of the potato virus Y group from peppers in Ghana. *Ann. Appl. Biol.* 69, 235
19. BURGESS, J. Y COL. (1973a). Effect of poli-L-ornithine on isolated tobacco mesophyll protoplasts: Evidence against stimulated pinocytosis. *Planta* 111, 199
20. BURGESS, J. Y COL. (1973b). The mechanism of infection of plant protoplasts by viruses. *Planta* 112, 323
21. BURGESS, J. Y COL. (1974a). Structural changes accompanying infection of tobacco protoplasts with two spherical viruses. *Planta* 117, 133-144
22. BURGESS, J. Y COL. (1974b). Structural and autoradiographic observations of the infection of tobacco protoplasts with pea enation mosaic virus. *Planta* 119, 247-256
23. BURGESS, J. Y FLEMING, E.N. (1974). Ultrastructural studies of the aggregation and fusion of plant protoplasts. *Planta (Berlin)* 118, 183-193

24. CARLSON, P.S. Y COL. (1972). Parasexual interspecific plant hybridization. Proc. Nat. Acad. Sci. (Wash) 69, 2292-2294
25. CHRISTIE, S.R. Y COL. (1968). Characterization and electron microscopy of a virus isolated from Bidens and Lepidium. Plant Disease Rep. 52, 763-768
26. CHUPEAU, Y. Y COL. (1974). Histophysiologie vegetale. Preparation et culture de protoplastes de divers Nicotiana. C.R. Acad. Sci. Paris 278, 1565
27. COCKING, E.C. (1960). A method for the isolation of plant protoplasts and vacuoles. Nature 187, 927-29
28. COCKING, E.C. (1966). An electron microscopic study of the initial stages of infection of isolated tomato fruit protoplasts by tobacco mosaic virus. Planta 68, 206-214
29. COCKING, E.C. (1970). Virus uptake, cell wall regeneration, and virus multiplication in isolated plant protoplasts. Int. Rev. Cytol. 28, 89-124
30. COCKING, E.C. (1972). Plant cell protoplasts - isolation and development. Ann. Rev. Pl. Physiol. 23, 29
31. COCKING, E.C. (1973a). Fine structure of culture plant cells. In Dynamic Aspects of Plant Ultrastructure. Ed. A.W. Robards. McGraw-Hill, New-York

32. COCKING, E.C. (1973b). Plant cell modification; problems and perspectives, In Protoplastes et fusion de cellules somatiques vegetales. p. 327-341. In Colloques Internat. du C.N.R.S. n° 212, Paris
33. COCKING, E.C. Y POJNAR, E. (1969). An electron microscopic study of the unfection of isolated tomato fruit protoplasts by tobacco mosaic virus. J. Gen Virol. 4, 305-312
34. CONSTABEL, F. Y KAO, K.N. (1974). Agglutination and fusion of plant protoplasts gy polyethylene glycol. Canad. J. Bot. 1603-1606 (1974)
35. COUTTS, R.H.A. Y COL. (1972). Infection of tobacco mesophyll protoplasts by tobacco mosaic virus. J. Gen Virol. 17, 289-294
36. DAMIRDAGH, I.S. Y SHEPHERD, R.J. (1970). Some of the chemical properties of the tobacco etch virus and its protein and nucleic acid components. Virology 40, 84-89
37. DAVEY, M.R. (1973). Isolation of protoplasts from leaves of leguminous plants, In "Plant tissue and cell culture" p. 110 Ed. H.E. Street.
38. DIAZ-RUIZ, J.R. (1971). Estudio sobre algunos virus de leguminosas. Tesis, Fac. de Farm., Madrid

39. DOI, Y. Y COL. (1965). Electron microscopy of tobacco leaf cells infected with cucumber mosaic virus. Ann. Phytopath. Soc. Japan 30, 264
40. DOI, Y. Y YORA, K. (1972). Comparative observation of cell nuclei infected with plant viruses. Ann. Phytopath. Soc. Japan 38, 216
41. DONBROW, M. (1967). Instrumental methods in analytical chemistry, vol. 2; Optical methods. Pitman, London
42. EDWARDSON, J.R. (1974). Some properties of the potato virus Y group. Florida Agr. Sta. Monograph, Sr. 4
43. EDWARDSON, J.R. Y COL. (1968). Structure of cytoplasmic inclusions in plant infected with rod-shaped viruses. Virology 34, 250-263
44. EDWARDSON, J.R. Y PURCIFULL, D.E. (1970). Turnip mosaic virus - induced inclusions. Phytopathology 60 85-88
45. ELLIS, E.L. Y DELBRUCK, M. (1939). The growth of bacteriophage. J. Gen. Physiol. 22, 365-384
46. EVANS, D.K. Y COL. (1972). Isolation of protoplasts from cereal leaves. Planta 104, 178-181
47. FRANCKI, R.I.B. Y COL. (1971). Metabolism of separated leaf cells. Uptake and incorporation of protein and ribonucleic acid precursors by tobacco cells.

Plant Physiol. 48, 14-18

48. FRANCKI, R.I.B. Y HABILI, N. (1972). Stabilization of capsid structure and enhancement of immunogeneticity of cucumber mosaic virus (Q-strain) by formaldehyde. Virology 48, 309-315
49. FREARSON, E.M. Y COL. (1973). The isolation and culture of Petunia leaf protoplasts. Develop. Biology 33, 130-135
50. FURUMOTO, W.A. Y WILDMAN, S.G. (1963). The specific infectivity of tobacco mosaic virus. Virology 20, 53
51. GAMBORG, O.L. Y COL. (1968). Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. Exp. Cell Res. 50, 151-158
52. GEROLA, F. Y COL. (1965). Some observations of the shape and localization of different viruses in experimentally infected plants. II Nicotiana glutinosa systemically infected with cucumber mosaic virus, strain Y. Caryologia 18, 567-597
53. GETTNER, M.E. Y HILLIER, J. (1950). Improved ultrathin sectioning of tissue for electron microscopy. J. Appl. Phys. 21, 889
54. GIBBS, A.J. Y COL. (1963). Properties of purified preparations of lucerne mosaic virus. Virology 19, 441

55. GIBBS, A.J. Y HARRISON, B.D. (1973). Cucumber mosaic virus. In Descriptions of Plant Viruses, n^o 1, C.M.I./A.A.B.
56. GIGOT, C. Y COL. (1972). Modifications ultrastructurales observées au cours de la preparation de protoplastes a partir de cultures de tissus de tabac. J. Ultrast. Res. 41, 418-432
57. GIGOT, C. Y COL. (1975). Subcellular changes during isolation and culture of tobacco mesophyll protoplasts. Protoplasma 84, 31-41
58. GLAUERT, A.M. Y CLAUERT, R.H. (1958). Araldite as an embedding medium for electron microscopy. J. Biophys. Biochim. Cytol. 4, 191
59. GOLDIN, M.E. (1963). Viral inclusions in plant cells and the nature of viruses. 2nd ed. Akad. Nauk URSS
60. GOLDSTEIN, B. (1924). Cytological study of living cells of tobacco plants affected with mosaic diseases. Bull. Torrey Bot. Club 51, 261-272
61. GOSCH, G. Y COL. (1975). Isolation, culture, and fusion studies on protoplasts from different species. Protoplasma 85, 327-336
62. GRAMBOW, H.J. Y COL. (1972). Cell division and plant development from protoplasts of carrot cell suspension cultures. Planta (Berlin) 103, 348-355

63. GREENWOOD, A.D. Y COL. (1963). The osmiophylic globules of chloroplasts. I: Osmiophylic globules as normal component of chloroplasts and their isolation and composition in *Vicia faba*, L. Biochem. Biophys. Acta 78, 148
64. GROUT, B.W.W. Y COL. (1972). Interaction at the surface of plant cell protoplasts; an electrophoretic and freeze-etch study. In "The role of membrane structure in biological energy transduction". J. Bioenergy (1972)
65. HALL, C.E. (1955). Electron densitometry of stained viruses particles. J. Biophys. Biochem. Cytol. 1, 1
66. HANSON, W. Y KREITLOW, K.W. (1953). The many ailments of clover. Yearbook of agriculture p. 217
67. HARRISON, B.D. Y COL. (1971). Sixteen groups of plant viruses. Virology 45, 356-363
68. HAYASHI, T. Y COL. (1965). Electron microscopy of intercellular turnip mosaic virus. Phytopathology 55, 458-461
69. HIBI, T. Y YORA, K. (1972). Electron microscopy of turnip mosaic virus infection in tobacco mesophyll protoplasts. Ann. Phytopathol. Soc. Jpn. 38, 350
70. HIBI, T. Y COL. (1975). Infection of cowpea mesophyll

protoplasts with cowpea mosaic virus. *Virology* 64, 308-318

71. HIEBERT, E. Y McDONALD, J.G. (1973). Characterization of some proteins associated with viruses in the potato Y group. *Virology* 56, 349-361
72. HILL, J.H. Y SHEPHERD, R.J. (1972). Biochemical properties of turnip mosaic virus. *Virology* 47, 807-816
73. HILL, J.H. Y COL. (1972). Characterization of maize dwarf mosaic virus strain B protein. *Phytopathology* 62, 764
74. HILL, J.H. Y COL. (1973). Purification and partial characterization of maize dwarf mosaic virus strain B. *J. Gen. Virol.* 20, 327-339
75. HITCHBORN, J.M. Y HILL, J.H. (1965). The use of negative staining in the electron microscopic examination of plant viruses in crude extracts. *Virology* 27, 528-540
76. HOLMES, F.O. (1964). Symptomology of viral diseases in plants. In "Plant virology" pp. 17-38. Univ. of Florida Press, Gainesville (Florida)
77. HONDA, Y. Y MATSUI, C. (1968). Electron microscopy of intracellular modifications of tobacco by mixed infections with cucumber mosaic and tobacco mosaic viruses. *Phytopathology* 58, 1230-1235

78. HONDA, Y. Y MATSUI, C. (1974). Electron microscipy of cucumber mosaic virus infected tobacco leaves showing mosaic symptoms. *Phytopathology* 64, 534-539
79. HONDA, Y. Y COL. (1974). Ultrastructure of tobacco mesophyll protoplasts inoculated with cucumber mosaic virus. *Phytopathology* 64, 30-34
80. HULL, R. Y COL. (1969). Electron microscopy on "in vivo" aggregation forms of a strain of alfalfa mosaic virus. *J. Ultrastruct. Res.* 26, 465
81. HUTTINGA, H. (1975). Properties of viruses of the poty virus group 3. A comparasion of bouyant density, S value, particle morphology and molecular weight of the coat protein subunit of 10 viruses and virus isolated. *Neth. J. Plant. Phathol.* 81, 58-63
82. HUXLEY, J. (1956). In electron microscopy. *Proc. Stocholm. Conf.* p. 260 Almgnist. Wiksell, Stocholm.
83. INOUYE, T. (1964). On the procedures for identification of the viruses of leguminous plants in Japan. *Nôgaku Kenkyû* 50, 103
84. IWANOWSKI, D.J.V.V. (1903). Uber die mosaikkrankheit der tabakspflanze. *Z. Pflancenkrankh* 13, 1-41
85. JONES, R.L. Y COL. (1973). Barley aleurone protoplasts: some observations on their structure and physiology. In "Protoplastes et fusion de cellules somati-

86. KAMEI Y COL. (1969). Intracellular apparence of turnip mosaic virus and bean yellow mosaic virus particles. *Phytopathology* 59, 139-144
87. KAMEYA, T. (1972). Embryoids derived from isolated protoplasts of carrot. *Planta* 103, 356-360
88. KAO, K.N. Y COL. (1971). Cell divisions in cell regenerated from protoplasts of soybean and *Haplopappus gracilis*. *Nature New Biology* 232, 124
89. KAO, K.N. Y COL. (1974). Plant protoplast fusion and growth of intergeneric hybrid cells. *Planta (Berl.)* 120, 215-227
90. KAPER, J.M. Y COL. (1965). Some physical and chemical properties of cucumber mosaic virus (strain Y) and of its isolated ribonocleic acid. *Virology* 27, 54
91. KAPER, J.M. Y WEST, C.K. (1972). Poliacrylamide gel separation and molecular weight determination of the components of cucumber mosaic virus-RNA. *Preparative Biochemistry* 2, 251-263
92. KARR, A.L. Y ALBERSHEIM, P. (1970). Polysacharide-degrading enzymes are unable to attack plant cell walls without prior action by a "wall-modifying enzyme". *Plant. Physiol.* 46, 69-80
93. KASSANIS, B. (1939). Intranuclear inclusions in virus

infected plants. Ann. Appl. Biol. 26, 705-709

94. KASSANIS, B. Y WHITE, R.F. (1974). A simplified method of obtaining tobacco protoplasts for infection with tobacco mosaic virus. J. Gen. Virol. 24, 447
95. KATCHALSKI, E. Y COL. (1964). Polyamino acids as protein models. In "The Proteins", ed. H. Neurath 2, 405-602 New York: Academic 2nd ed 4 vol. 840 pp.
96. KELLER, W.A. Y COL. (1973). Determination of the frequency of interspecific protoplast fusion by differential staining. In, Protoplastes et fusion de cellules somatiques vegetales p. 456-463. Paris: C.N.R.S.
97. KELLEY, J.J. Y KAESBERG, P. (1962). Biophysical and biochemical properties of top component and bottom component of alfalfa mosaic virus. Biochim. Biophys. Acta 61, 865
98. KOENIG, R. (1972). Anomalous behavior of the coat proteins of potato virus X and cactus virus X during electrophoresis in dodecyl sulfate-containing polyacrylamide gels. Virology 50, 263-266
99. KOIKE, M. Y COL. (1977). Infection of cowpea mesophyll protoplasts with cucumber mosaic virus. Virology 83, 413-416

100. KUBO, S. Y COL. (1974). Effect of phosphate on the infection of tobacco protoplasts by tobacco rattle virus. Intervirology 3, 382-387
101. KUBO, S. Y COL. (1975). Tobacco rattle virus in tobacco mesophyll protoplasts: infection and virus multiplication. J. Gen. Virol. 27, 293-304
102. KUBO, S. Y COL. (1976). Uptage of tobacco rattle virus by tobacco protoplasts, and the effect of phosphate on infection. J. Gen. Virol. 30, 287-298
103. LANE, L.C. (1974). The components of barley stripe mosaic and related viruses. Virology 58, 323-333
104. LAZAR, G. Y COL. (1973). Osmotic shock triggers an increase in ribonuclease level in protoplasts isolated from tobacco leaves. Plant. Sci. Lett. 1, 53-57
105. LITTAU, V.C. Y BLACK, L.M. (1952). Spherical inclusion in plant tumors caused by a virus. Amer. J. Bot. 39, 87-95
106. LOT, H. Y COL. (1972). Contribution á l'estude du virus de la mosaïque du coucombres. II Methode de purification rapide du virus. Ann. Phytopathol. 4, 25
107. LOT, H. Y KAPER, J.M. (1976). Physical and chemical differentiation of three strains of cucumber mosaic virus and peanut stunt virus. Virology 74, 209-222

108. LUFT, J.H. (1961). Improvement in epoxy resin embedding methods. J. Biophys. Biochem. Cytol. 9, 409
109. MATILE, P. (1969). Plant lysosomes in biology. In Front Biol. 14, 406-430
110. MATSUI, C. Y YAMAGUCHI (1964). Electron microscopy of host cells infected with tobacco etch virus. I. Fine structure of leaf cells at later stages of infection Virology 22, 40-47
111. MATTHEWS, R. (1970). "Plant Virology". Ed. Academic Press.
112. McDONALD, J.G. Y HIEBERT, E. (1975). Characterization of the capsid and cylindrical inclusion proteins of three strains of turnip mosaic virus. Virology 63, 295-303
113. McWHORTER, F.P. (1941). Isometric crystals produced by pisum virus 2 and phaseolus virus 2. Phytopathology 31, 760-761
114. MEYER, Y. Y ABEL, W.O. (1975). Budding and cleavage division of tobacco mesophyll protoplasts in relation to pseudo-wall and wall formation. Planta 125, 1-13
115. MILLONIG, G. (1961). A modified procedure for lead staining of thin sections. J. Biophys. Biochem. Cytol. 11, 736-739

116. MISAWA, T. Y EHARA (1966). Electron microscopic observation of host cells infected with cucumber mosaic virus. Tohoku, J. Agric. Res. 16, 159-173
117. MOGHAL, S.M. Y FRANCKI, R.I.B. (1976). Towards a system for the identification and classification of Potyviruses. Virology 73, 350-362
118. MOTOYOSHI, F. Y COL. (1973). The infection of tobacco protoplasts with cowpea chlorotic mottle virus and its RNA. J. Gen. Virol. 20, 177-193
119. MOTOYOSHI, F. Y HULL, R. (1974). The infection of tobacco protoplasts with pea enation mosaic virus. J. Gen. Virol. 24, 89-99
120. MOTOYOSHI, F. Y COL. (1974). The infection of tobacco protoplasts with a variant of brome mosaic virus. J. Gen. Virol. 25, 31-36
121. MOTOYOSHI, F. Y COL. (1975a). Factors influencing the infection of tobacco protoplasts by cowpea chlorotic mottle virus..J.Gen. Virol. 25, 245-256
122. MOTOYOSHI, F. Y COL. (1975b). Infection of tobacco mesophyll protoplasts by alfalfa mosaic virus. J. Gen. Virol. 27, 263-266
123. MOTOYOSHI, F. Y OSHIMA, N. (1976). The use of tris-ClH buffer for inoculation of tobacco mosaic virus. Jour. Molec. Biol. 35, 643-646

124. MOTOYOSHI, F. Y OSHIMA, N. (1977). Expression of genetically controlled resistance to tobacco mosaic virus infection tomato leaf mesophyll protoplasts. J. Gen Virol. 34, 499-506
125. NAGARAJ, A.N. (1962). Fluorescent antibody staining of viral antigen in dissociated plant cells. Virology 18, 329-332
126. NAGATA, T. Y TAKEBE, I. (1971). Platting of isolated tobacco mesophyll protoplasts on agar medium. Planta (Berlin) 99, 12-20
127. NICKELL, L.G. Y TORREY, J.G. (1969). Crop improvement through plant cell and tissue culture. Science 166 1068-1069
128. OTSUKI, Y. Y COL. (1972). Ultrastructure of infection of tobacco mesophyll protoplasts by tobacco mosaic virus. Virology 49, 188-194
129. OTSUKI, Y. Y TAKEBE, I. (1973). Infection of tobacco mesophyll protoplasts by cucumber mosaic virus. Virology 52, 433-438
130. OTSUKI, Y. Y COL. (1974). Infection of tobacco mesophyll protoplasts by potato virus X. J. Gen. Virol. 22, 375-385
131. OTSUKI, Y. Y TAKEBE, I. (1976). Double infection of isolated tobacco mesophyll protoplasts by unrelated

plant viruses. J. Gen. Virol. 30, 309-316

132. PALADE, G.E. (1952). A study of fixation for electron microscopy. J. Exptl. Med. 104, 171-182
133. PEACOCK, A.C. Y DINGMAN, C.W. (1967). Resolution of multiple ribonucleic acid species by polyacrylamide gel electrophoresis. Biochemistry 6, 1818-1827
134. PELCHER, L.E. Y COL. (1974). Bean mesophyll protoplast: production, culture, and callus formation. Plant. Sci. Lett. 3, 107-111
135. PIERCE, W.H. (1934). Viroses of the bean. Phytopathology 24, 87-115
136. PILET, P.E. (1971). Effects de quelques auxines sur les protoplastes racinaires. C.R. hebdomadaire des Seances Acad. Sci., Paris 273, 2253-2256
137. PILET, P.E. Y COL. (1972). Morphology, RNAase and transaminase of root protoplasts. Pl. Cell. Physiol. 13 297-309
138. PORTER, C.A. Y McWHORTER (1952). Crystalline inclusions produced by red clover vein mosaic virus. Phytopathology 42, 518
139. POTRYKUS, I. (1971). Intra and interspecific fusion of protoplasts from petals of *Torenia baillonii* and *Torenia fournieri*. Nature (Lond) New Biol. 231, 51-58

140. POWER, J.B. (1971). The isolation, behaviour and fusion of higher plant protoplasts. Ph. D. Thesis, University of Nottingham, England.
141. POWER, J.B. Y COCKING, E.C. (1970). Isolation of leaf protoplasts: macromolecule uptake and growth substance response. *J. Exp. Bot.* 21, 64-70
142. POWER, J.B. Y COL. (1970). Fusion of isolated plant protoplasts. *Nature (Lond)* 225, 1016-1018
143. POWER, J.B. Y COL. (1971). The preparation and culture of spontaneously fused tobacco leaf spongy-mesophyll protoplasts. *Biochem. J.* 123, 29-30
144. PRAT, R. Y POIRIER-HAMON, S. (1975). Caractéristiques ultrastructurales des parois cellulaires d'embryoïdes obtenus à partir de protoplastes d'*Antirrhinum majus*, L. *Protoplasma* 86, 175-178
145. PURCIFULL, E.E. (1966). Some properties of tobacco etch virus and its alkaline degradation products. *Virology* 29, 8-14
146. PURCIFULL, E. E. Y COL. (1973). Immunochemical specificity of cytoplasmic inclusions induced by viruses in the potato Y group. *Virology* 55, 275-279
147. REINERT, J. Y HELLMANN, S. (1971). Mechanism of the formation of polynuclear protoplasts from cells of

higher plants. Naturwissenschaften 58, 419

148. REINERT, J. Y HELLNANN, S. (1973). Aspects of nuclear division and cell wall formation in protoplasts of different origin pp. 273-279. In: Colloq. Internat. C.N.R.S. (Versailles) Ed. de l'Institut. Nat. Rech. Agron., Paris.
149. REYNOLDS, E.S. (1963). The use of lead citrate at high pH as an electron-opaque, stain in electron microscopy. J. Cell. Biol. 17, 208
150. ROBB, M. (1964). Location, structure and cytochemical staining reactions of the inclusion bodies found in *Dahlia variabilis* infected with dahlia mosaic virus. Virology 23, 141-144
151. RUBIO-HUERTOS, M. (1950). Estudios sobre inclusiones intracelulares producidas por virus en las plantas. Microbiol. Span. 3, 207-232
152. RUBIO-HUERTOS, M. (1956). Origin and composition of cell inclusions associated with certain tobacco and crucifer viruses. Phytopathology 45, 553-556
153. RUBIO-HUERTOS, M. (1962). Efectos de la temperatura sobre la sintomatología del virus "Ringspot" de la *petunia*. Microbiol. Espan. 15, 1-11
154. RUBIO-HUERTOS, M. (1968). Further studies on ultras-

structure of plants infected with petunia ringspot virus. *Protoplasma* 65, 465-476

155. RUBIO-HUERTOS, M. (1972). Inclusion Bodies. In Principles and techniques in plant virology. pp. 62-75
Ed. Kado/Agrawal
156. RUBIO-HUERTOS, M. Y VELA CORNEJO, A. (1966). Light and electron microscopy of virus inclusions in "Amaranthus lividus" cells. *Protoplasma* 62, 184-193
157. RUBIO-HUERTOS, M. Y COL. (1967). Clasificación y distribución de algunos virus de leguminosas en España
Anal. de Edaf. y Agrobiol. 26, 763
158. RYSER, H.J.P. (1968). Uptake of protein by mammalian cells. *Science* 159, 390-396
159. RYTER, A. Y KELLENBERGER, E. (1958). L'inclusion au polyester pour l'ultramicrotomic. *J. Ultras. Res.* 2, 200-209
160. SABATINI, D.D. Y COL. (1963). Cytochemistry and electron microscopy. The preservation of cellular ultrastructure and enzymic activity by aldehyde fixation. *J. Cell. Biol.* 17, 19-58
161. SAKAI, F. Y TAKEBE, I. (1970). RNA and protein synthesis in protoplasts isolated from tobacco leaves.
Biochim. Biophys. Acta 224, 531-540

162. SAKAI, F. Y TAKEBE, I. (1972). A non-coat protein synthesized in tobacco mesophyll protoplasts infected by tobacco mosaic virus. *Mol. Gen. Genet.* 118, 93
163. SARKAR, S. Y COL. (1974). A highly efficient method of inoculation of tobacco mesophyll protoplasts with ribonucleic acid of tobacco mosaic virus. *Mol. Gen. Genetic.* 135, 1-9
164. SCHASKOLSKAYA, N.D. Y COL. (1973). Colloq. Int. Cent. Nat. Rech. Sci. 212, 93
165. SCHENK, R.U. Y HILDEBRANDT, A.C. (1969). Production of protoplasts from plant cells in liquid culture using purified commercial cellulases. *Crop. Sci.* 9, 629-631
166. SCHULTZ, E.S. (1921). Transmission, variation and control of certain degeneration diseases of Irish potatoes. *J. Agric. Res.* 22, 173
167. SCHUSTER, H. (1964). Techniques in experimental virology. R.J.C. Harris, Academic Press (N.Y.), p. 60
168. SHALLA, T.A. Y SHEPARD, J.F. (1972). The structure and antigenic analysis of amorphous inclusion bodies induced by potato virus X. *Virology* 49, 654-667
169. SHALLA, T.A. Y PETERSEN, L.J. (1973). Infection of isolated plant protoplasts with potato virus X. *Phyto*

170. SHEFFIELD, F.M. (1931). The formation of intracellular inclusions in solanaceous hosts infected with aucuba mosaic of tomato. *Ann. Appl. Biol.* 18, 471-493
171. SHEFFIELD, F.M. (1934). Experiments bearing on the nature of intracellular inclusions in plant virus diseases. *Ann. Appl. Biol.* 21, 440-453
172. SHEPARD, J.F. Y TOTTON, R.E. (1975). Isolation and regeneration of tobacco mesophyll protoplasts under low osmotic conditions. *Plant. Physiol.* 55, 689-694
173. SHEPHERD, R.J. Y POUND, G.S. (1960). Purification of Turnip mosaic virus. *Phytopathology* 50, 797-803
174. SHEPHERD, R.J. Y COL. (1976). New groups of plant viruses approved by the International Committee on Taxonomy of Viruses. *Intervirology* 6, 181-184
175. STACE-SMITH, R. Y TREMAINE, J.H. (1970). Purification and composition of potato virus Y. *Phytopathology* 60, 1785-1789
176. TAKEBE, I. (1975). The use of protoplasts in plant virology. *Ann. Rev. Phytopathol.* 13, 105-125
177. TAKEBE, I. Y COL. (1968). Isolation of tobacco mesophyll cells in intact and active state. *Plant. Cell. Physiol.* 9, 115-124

178. TAKEBE, I. Y OTSUKI, Y. (1969). Infection of tobacco mesophyll protoplasts by tobacco mosaic virus. Proc. Nat. Acad. Sci. (USA) 64, 843-848
179. TAKEBE, I. Y COL. (1971). Infection of isolated tobacco mesophyll protoplasts by tobacco mosaic virus. In "Les cultures de tissus de plantes". Ed. L.Hirth 503-511. Paris: Centre Nat. Rech. Sci. 511 pp.
180. TAKEBE, I. Y NAGATA, T. (1973). Culture of isolated tobacco mesophyll protoplasts. In Protoplastes et Fusion de Cellules Somatiques Végétales, Ed. J. Tempé 175-187. Paris: Inst. Nat. Rech. Agron.
181. TAKEBE, I. Y COL. (1973). Fine structure of isolated mesophyll protoplasts of tobacco. Planta 113, 21-27
182. TAKEBE, I. Y COL. (1974). Penetration of plant viruses into isolated tobacco leaf protoplasts. Congres. Int. Assoc. Microbiol. Soc. Ed. T. Hasegawa 3, 55-68. Tokyo: Jpn. Assoc. Microbiol. 5 vols. 662pp.
183. TSAO, P.W. (1963). Intranuclear inclusion bodies in the leaves of cotton plants infected with leaf crumple virus. Phytopathology 53, 243-244
184. UYEMOTO, J.K. Y COL. (1972). Serological relationship and detection of bean common and bean yellow mosaic

viruses in agar gel. Ann. Appl. Biol. 71, 235-242

185. VARMA, A. Y COL. (1968). Some observations on the structure of the filamentous particles of several plant viruses. J. Gen. Virol. 2, 107-114

186. WALLIN, A. Y ERIKSSON, T. (1973). Protoplasts cultures from cell suspensions of "Daucus carota". Physiol. Plant. 28, 33-39

187. WATSON, M.L. (1958). Staining of tissue sections for electron microscopy with heavy metal. J. Biophys. Biochem. Cytol. 4, 727

188. WATTS, J. Y COL. (1974). Problems associated with the production of stable protoplasts of cells of tobacco mesophyll. Ann. Bot. 38, 667-671

189. WEATHERS, J.R. (1972). A disease of green ball cauliflower caused by turnip mosaic virus. Plant disease reporter 56, 441-442

190. WEINTRAUB, M. Y RAGETLI, H.W.J. (1966). Fine structure of inclusions and organelles in *Vicia faba* infected with bean yellow mosaic virus. Virology 28, 290

191. WEINTRAUB, M. Y RAGETLI, H.W.J. (1968). Intracellular characterization of bean yellow mosaic virus indu-

ced inclusions by differential enzyme digestion. J. Cell. Biol. 38, 316

192. WILLISON, J.H.N. Y COCKING, E.C. (1972). The production of microfibrils at the surface of isolated tomato-fruit protoplasts. Protoplasma 75, 397-403

193. WITHERS, L.A. Y COCKING, E.C. (1972). Fine structural studies on spontaneous and induced fusion of higher plant protoplasts. J. Gen. Sci. 11, 59-75

194. WOODS, M.W. Y ECK, R.V. (1948). Nuclear inclusions produced by a strain of tobacco mosaic virus. Phytopathology 38, 852-856

195. ZAITLIN, M. (1959). Isolation of tobacco leaf cells capable of supporting virus multiplication. Nature (Lond) 184, 1002-1003

196. ZAPATA, F.J. Y COL. (1977). The effect of temperature on the division of leaf protoplasts of *Lycopersicon esculentum* and *L. paruvianum*. Plant. Sci. Lett. 8, 119-124

197. ZITTER, T.A. Y COOK, A.A. (1973). Inheritance of tolerance to a virus infecting pepper in Florida. Phytopathology 63, 1211-1212

CAPITULO VII. FIGURAS

Figura 1. Protoplastos aislados de plantas superiores

A: *Nicotiana tabaccum* var. "White Burley" (X 400)

B: *Matthiola annua* (X 800)

C y D: *Vicia faba* var. "Aguadulce" (X 800)

Figura 2. División de protoplastos de *Vicia faba*

A,B y C: División desigual (X 800)

D y E: Bipartición (700)

F: Formación de yemas (X 800)

G: Fusión espontanea (X 700)

Figura 3. División de protoplastos de *Matthiola annua*

A: Bipartición (X 1500)

B: Gemación (X 800)

C: Bipartición y gemación (X 800)

D y E: Formación de embrioides (X 800)

Figura 4. Secciones ultrafinas de protoplastos sanos

A: Aspecto general (X 10.000)

B: Cloroplastos englobando mitocondrias (X 17600)

Figura 5. Alteraciones encontradas en protoplastos sanos

A: Cloroplasto englobando mitocondrias (X 38000)

B y C: Formación de masas densas (X 7000 y 30800)

MD=masas densas; P=plasmalema

Figura 6. Protoplastos infectados por TuMV

A: Aspecto general (X 6000)

B y C: Inclusiones formadas por TuMV (X17600 y 9600)

IV=inclusiones virales; A=anillos; R=rosetas

Figura 7. Protoplastos infectados por TuMV

- A: Inclusiones de virus (X 20400)
- B: Densas inclusiones junto a anillos (X 30000)
- C: Inclusiones densas y anillos gruesos (X 44000)

Figura 8. Protoplastos infectados por BYMV

- A: Cristales de proteína (P) junto a inclusiones densas (x 22500)
- B: Cuerpos de inclusión con barras densas (x 22500)

Figura 9. Protoplastos infectados por BYMV

- A: Fibrillas (F) junto a inclusiones (X 42000)
- B: Inclusiones densas cerca del núcleo (X 30000)
- C: Túbulos rodeados por masas densas (T) X 33500

Figura 10. Masas citoplásmicas envolviendo túbulos

- A: Formación de las masas densas (MD) (X 43000)
- C: Detalle de los túbulos y masas (X 52000)

Figura 11. Protoplastos infectados con el virus esférico

- A: Partículas de virus junto al plasmalema (P) (X 85000)
- B: Agregados cristalinos de partículas de virus (X 57200)
- C: Partículas de virus en el citoplasma (X 70000)

Figura 12. Síntomas producidos por TuMV en *Brassica napus*

Figura 13. Síntomas producidos por TuMV

- A: *Matthiola annua*
- B: *Cherianthus cheiri*
- C: *Chenopodium quinoa*, lesiones locales

Figura 14. Purificado de TuMV (X 59800)

Figura 15. Tinción negativa de inclusiones virales

A y B: Inclusiones laminares (X 62000 y 70400)

C y D: Inclusiones irregulares (X 69000)

E: Resultado de la electroforesis de la proteína viral de TuMV

Figura 16. Tejidos infectados por TuMV

A: Inclusiones en forma de peine (IP) junto a anillos e inclusiones densas (X 48400)

B: Formaciones fibrilares (F) relacionadas con dobles membranas; anillos e inclusiones en peine (X 48400)

Figura 17. Tejidos infectados por TuMV

A: Haces de partículas seccionadas (V) mas inclusiones densas y fibrillas (X 48400)

B: Inclusiones próximas al núcleo (X 55100)

Figura 18. Tejidos infectados por TuMV

A y B: Inclusiones complejas (IC) próximas al núcleo (X 57000 y 55100)

PL=inclusión en placa; CP=cloroplasto

Figura 19. Síntomas producidos por BYMV

A y B: Vicia faba var. "Aguadulce"

C: Chenopodiun amaranticolor

D: Chenopodium quinoa

Figura 20. Tinción negativa de BYMV

A: Purificado del virus (X 56800)

- B: Inclusión en forma de ovillo (X 35000)
- C: Resultado de la electroforesis de la proteína viral de BYMV

Figura 21. Tejidos infectados por BYMV

- A y B: Largas inclusiones densas junto a cristales de proteínas (P) (X 41800 y 39600)

Figura 22. Tejidos infectados por BYMV

- A: Cristales de proteína entre inclusiones densas y rosetas (X 45100)
- B: Inclusiones en barras flexuosas (IF) (X 20300)
- C: Fibrillas entre inclusiones densas (X 45100)

Figura 23. Alteraciones producidas por BYMV

- A y C: Desorganización de los cloroplastos (30000)
- B: Nucleolo dividido en dos partes
- C y D: Sistema de membranas mielínicas=SM (30000)

Figura 24. Síntomas producidos por el virus esférico

- A: Lesiones en *Nicotiana tabacum* var "W. B."
- B: *Spinacea oleracea* sana (drcha) y enferma (izq)
- C: *Petunia hybrida*
- D: *Chenopodium amaranticolor*, lesiones locales

Figura 25. Purificado del virus esférico

- A: Tinción negativa con PTA no-fijada (X 77000)
- B: Tinción negativa con PTA fijada (X 91000)
- C: Tinción con acetato de uranilo (X 91000)
- D: Resultado de la electroforesis del RNA del virus esférico.

Figura 26. Tejidos infectados con el virus esférico

A: Grupo de partículas de virus en el núcleo
(X 82000)

B: Partículas aisladas próximas al nucleolo
(X 82000)

V=partículas de virus; N=núcleo; n=nucleolo

Figura 27. Tejidos infectados con el virus esférico

A y B: Partículas de virus en el núcleo (X 91000)

C: Fibrillas próximas al nucleolo (X 70200)

F= masas de fibrillas

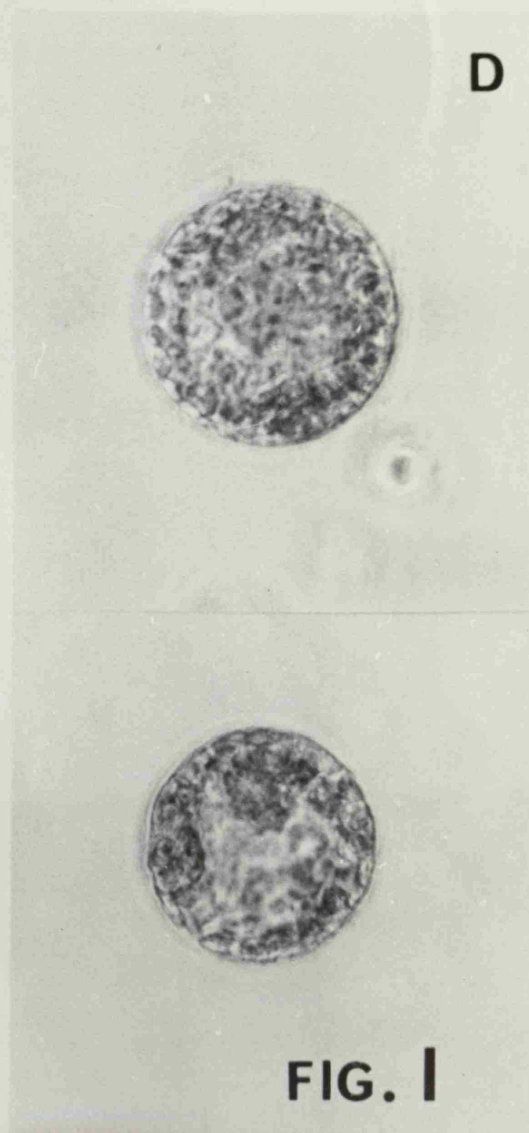
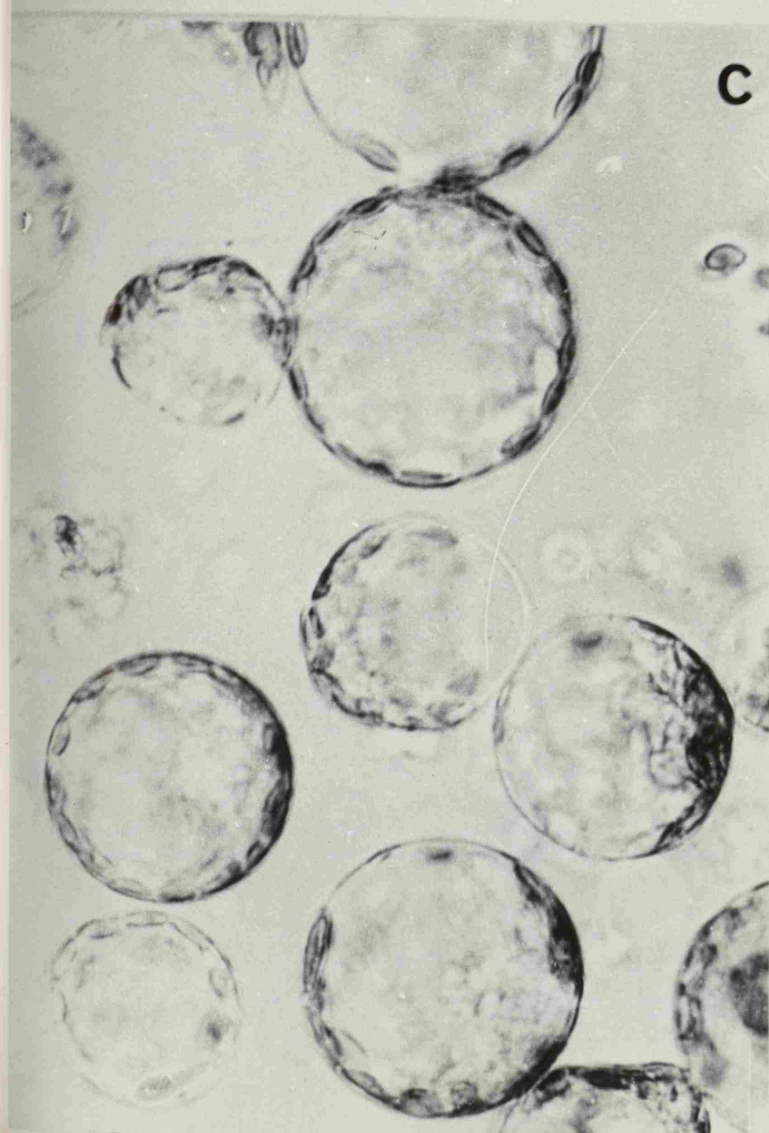
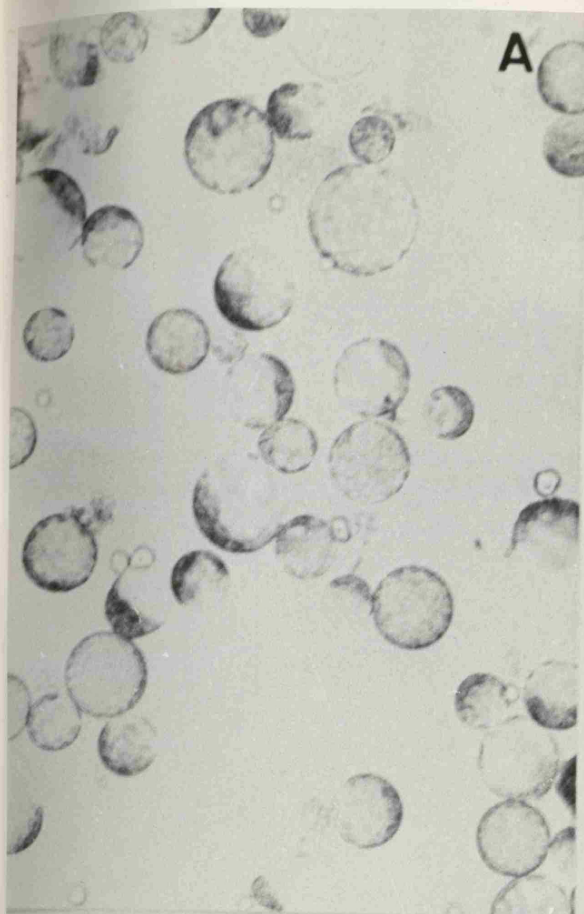


FIG. I

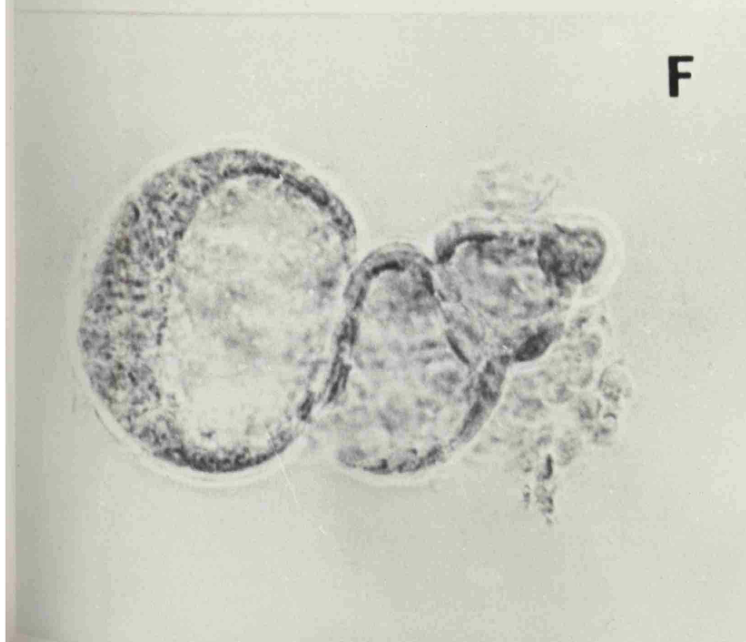
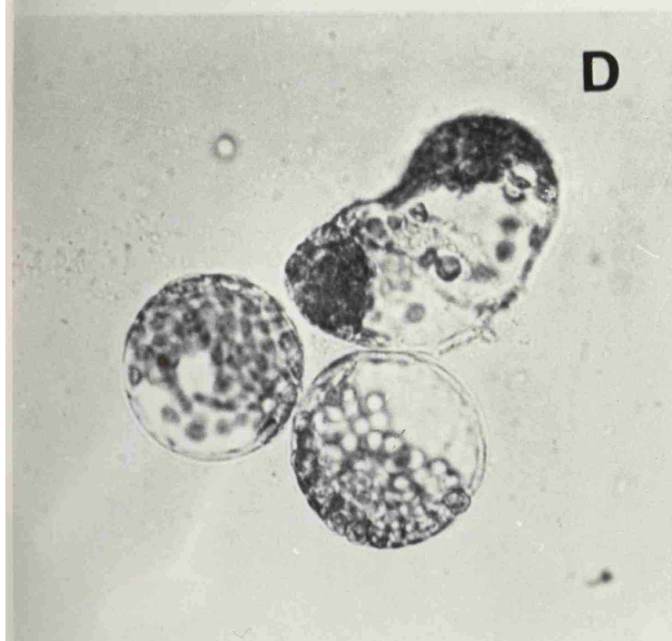
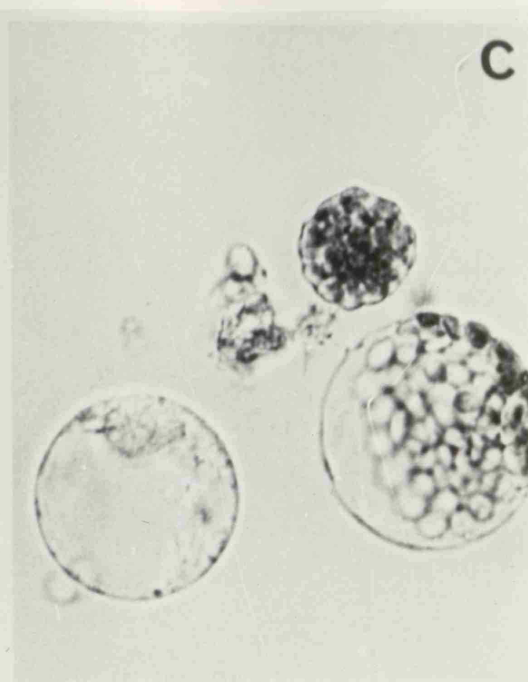
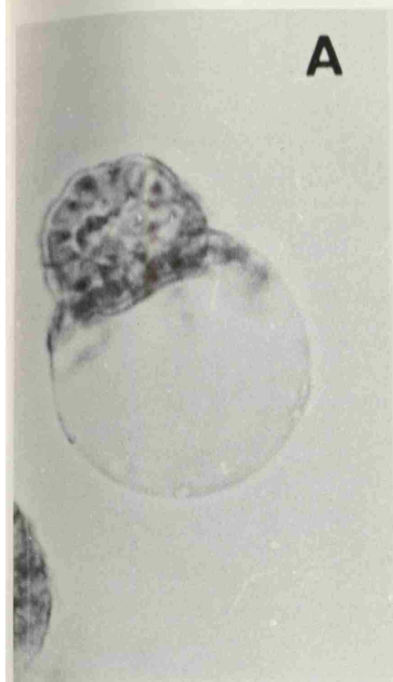


FIG. 2

A

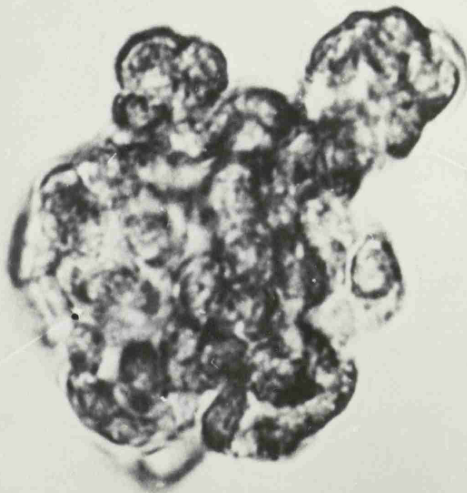
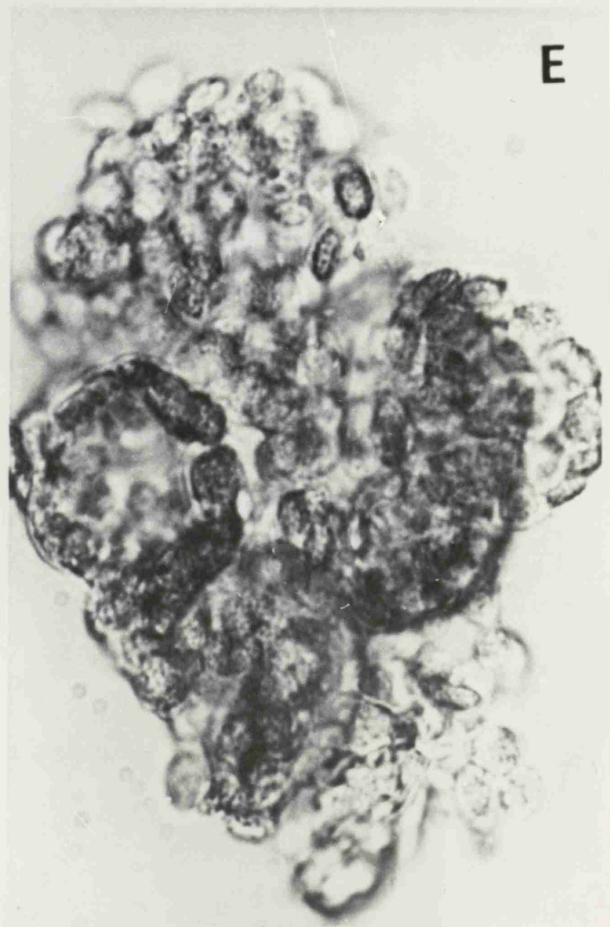
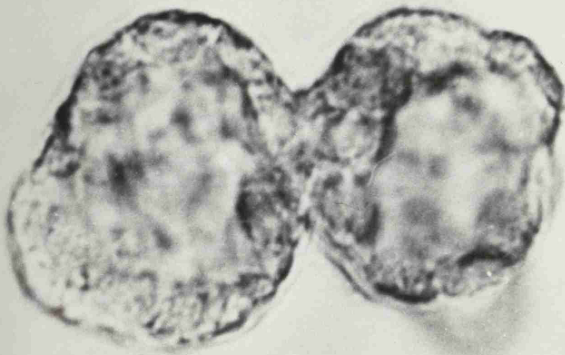
B

C

E

D

FIG. 3



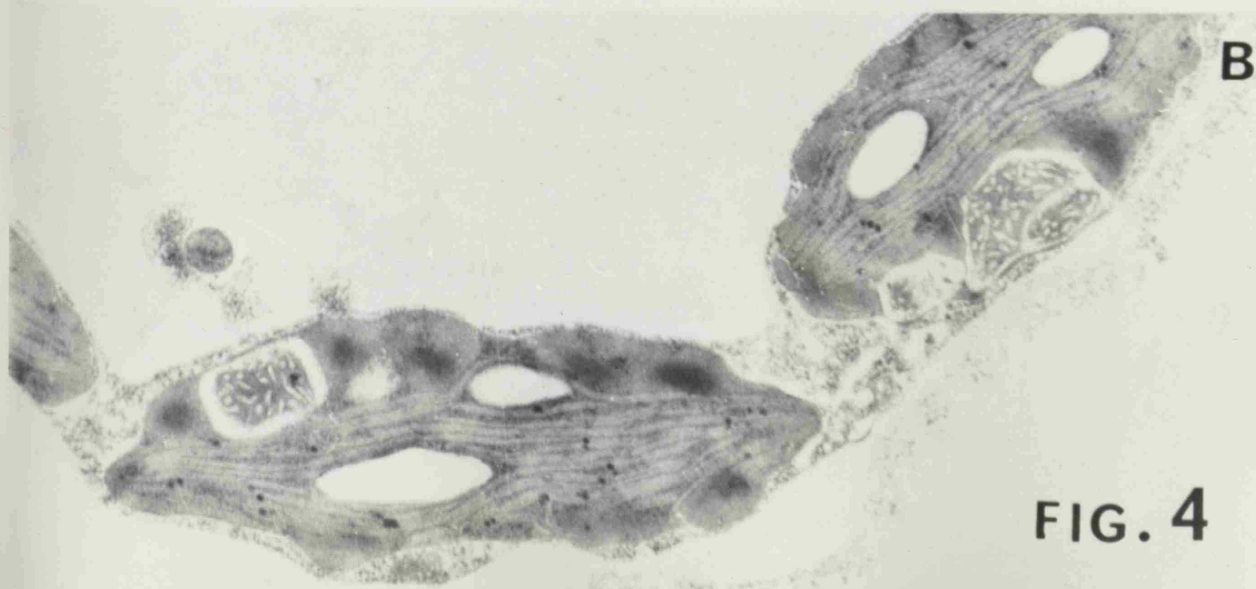


FIG. 4

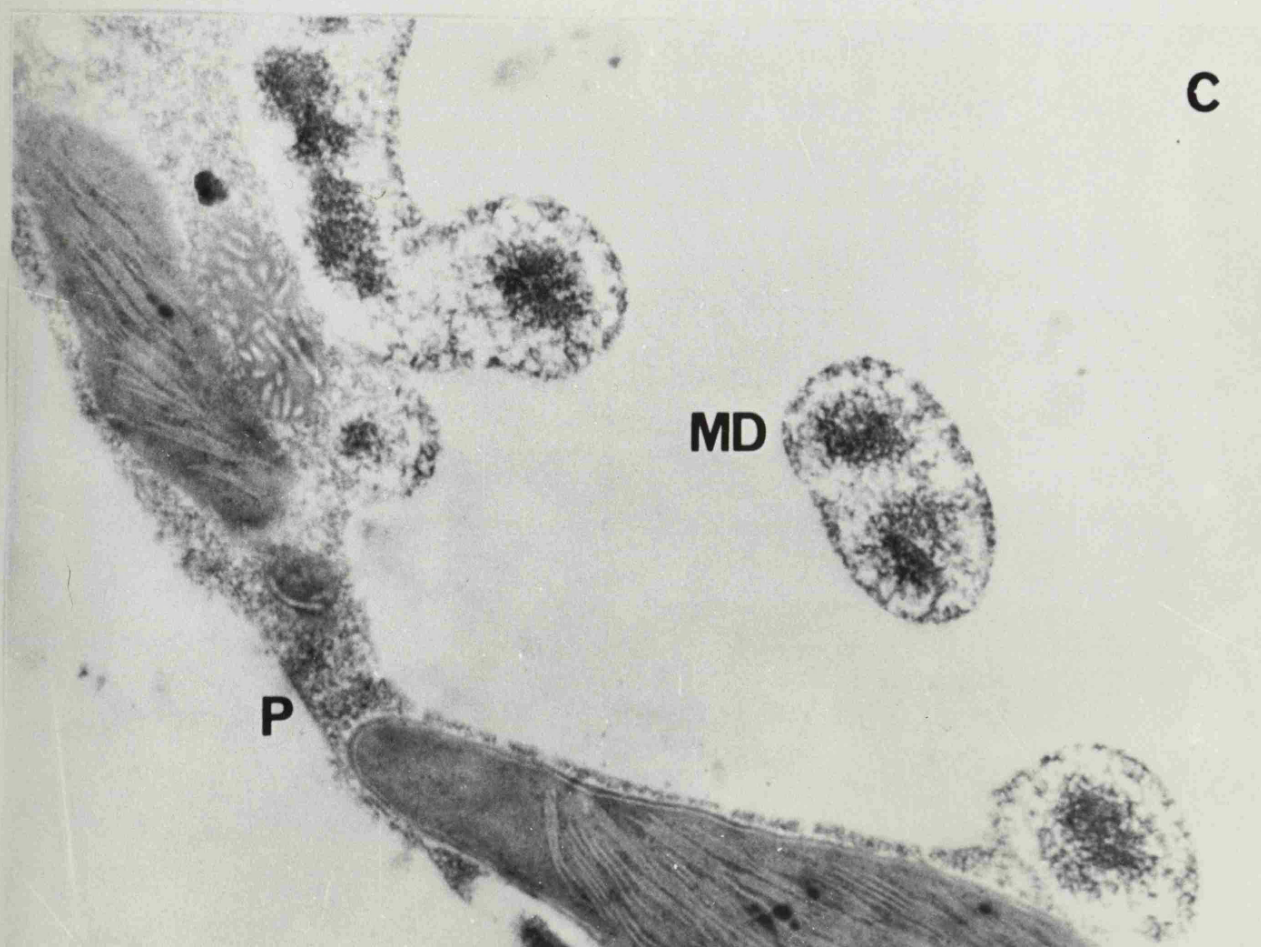


FIG. 5

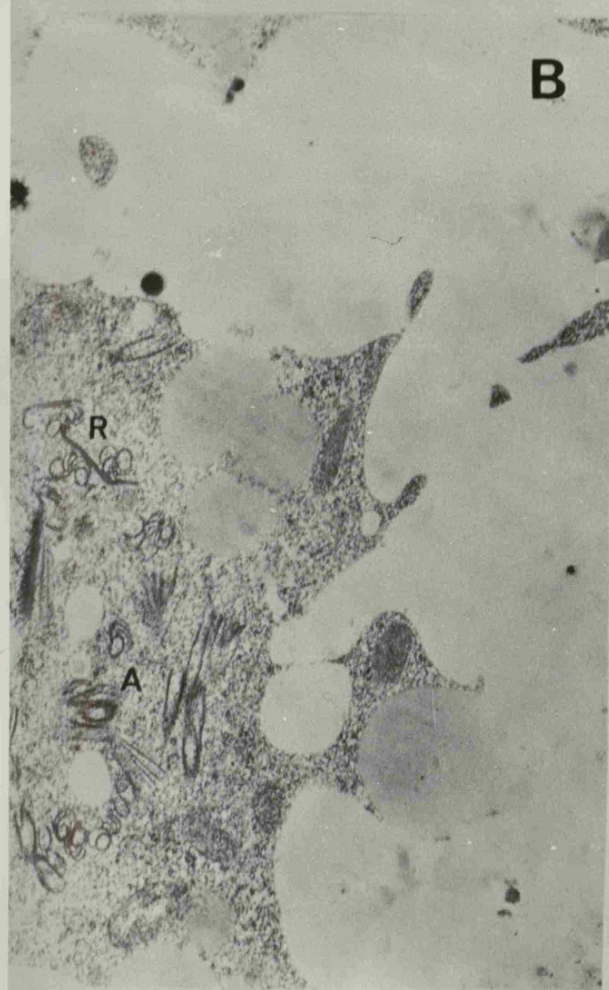
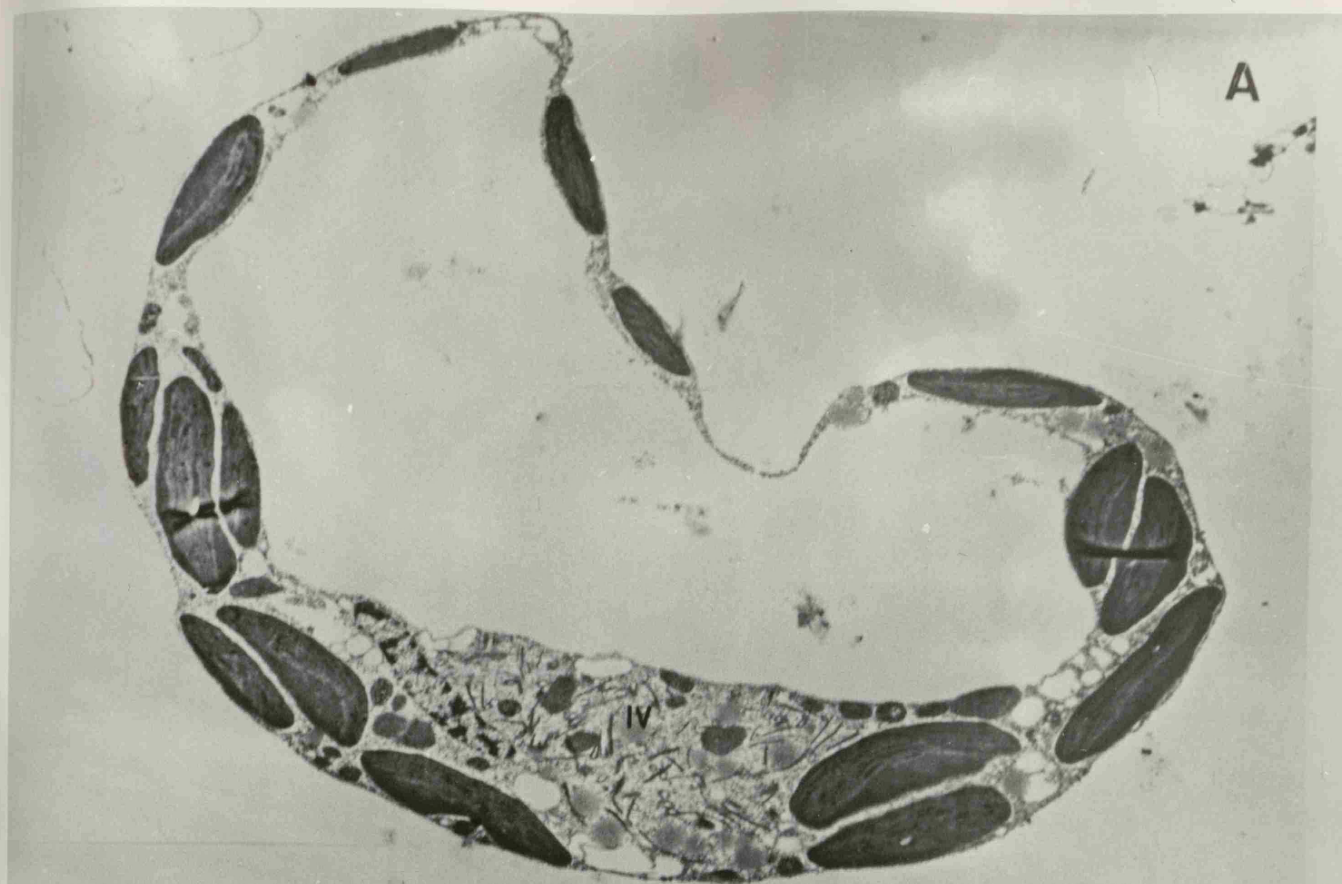


FIG. 6

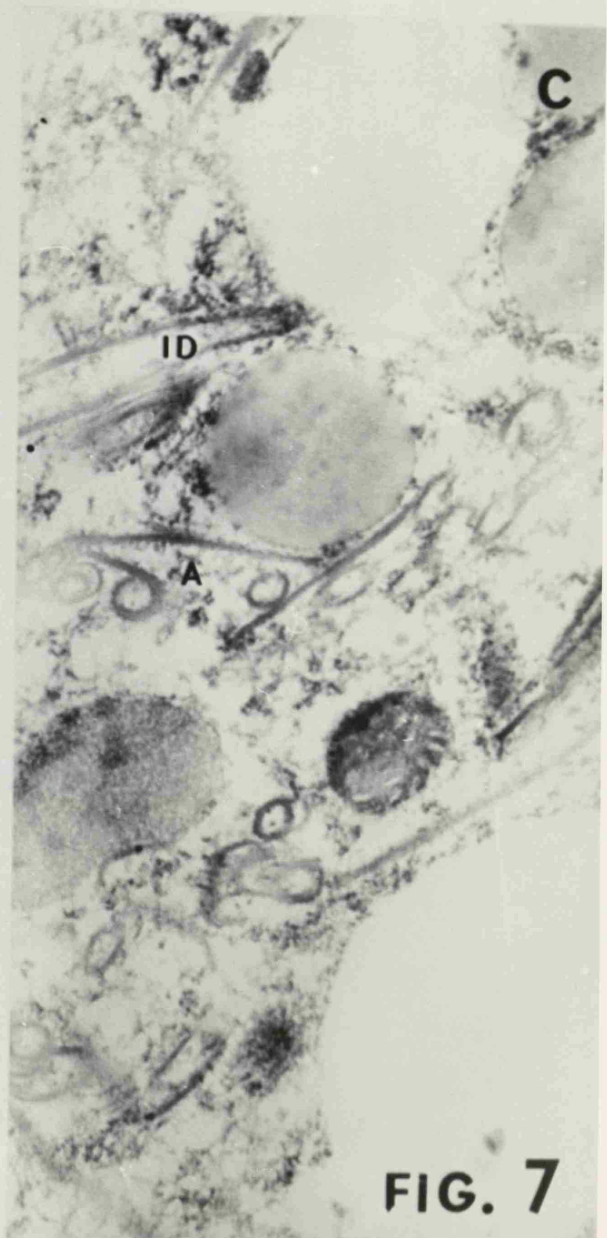
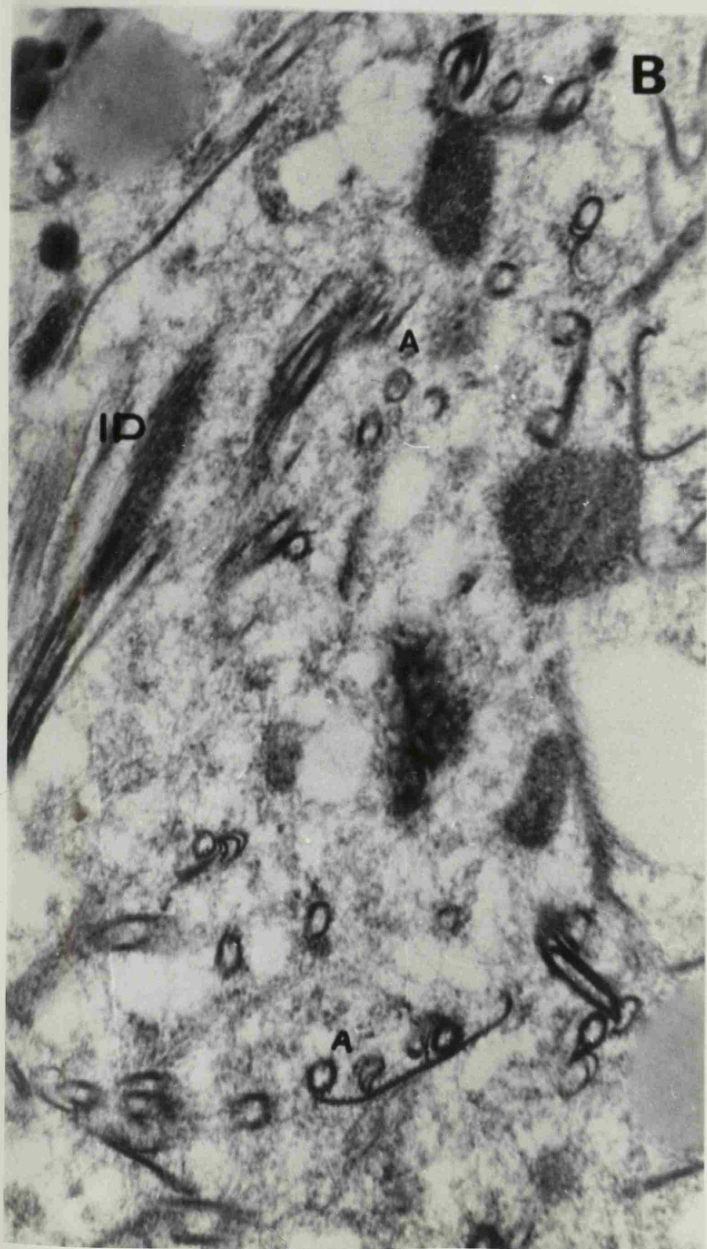


FIG. 7

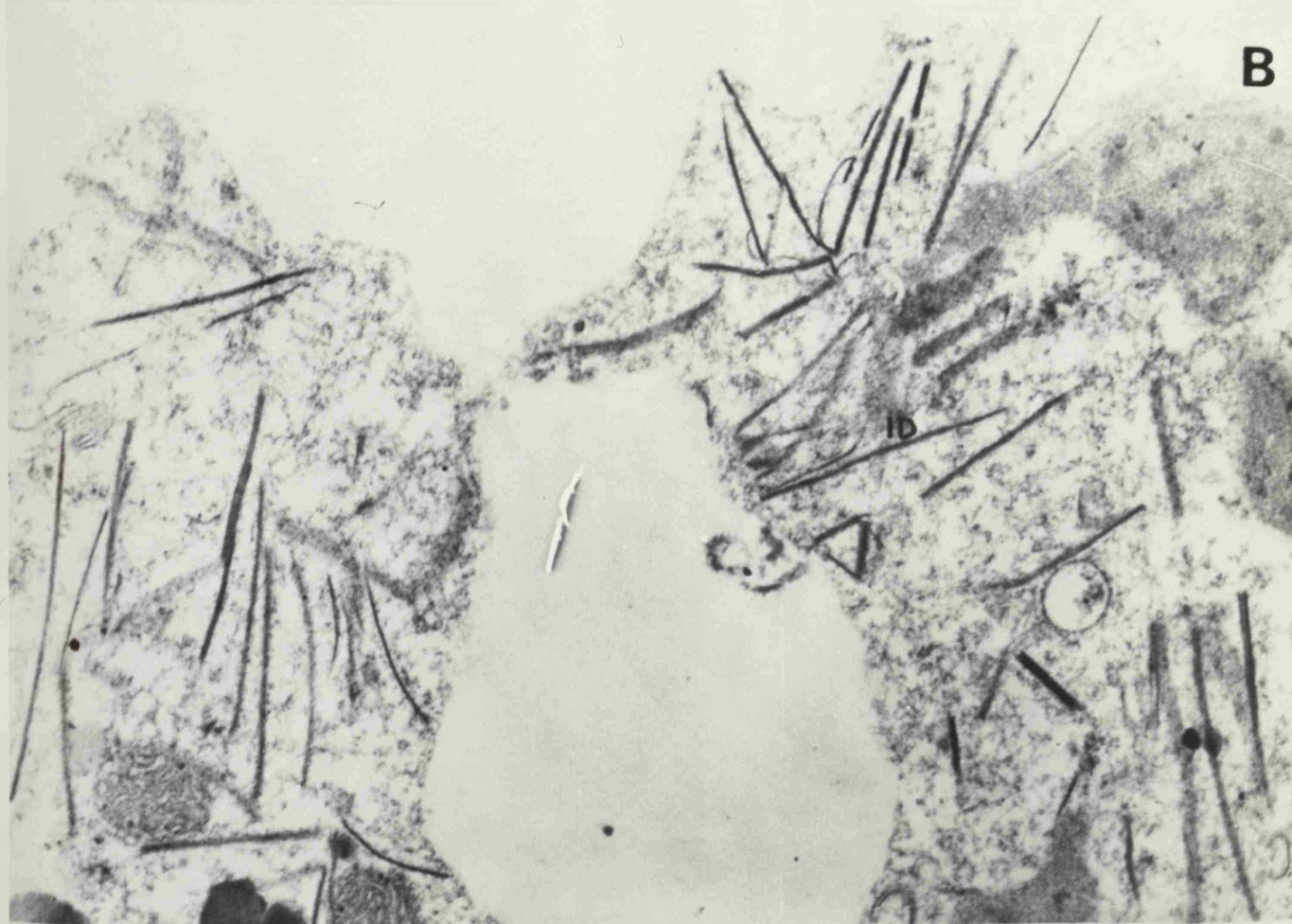
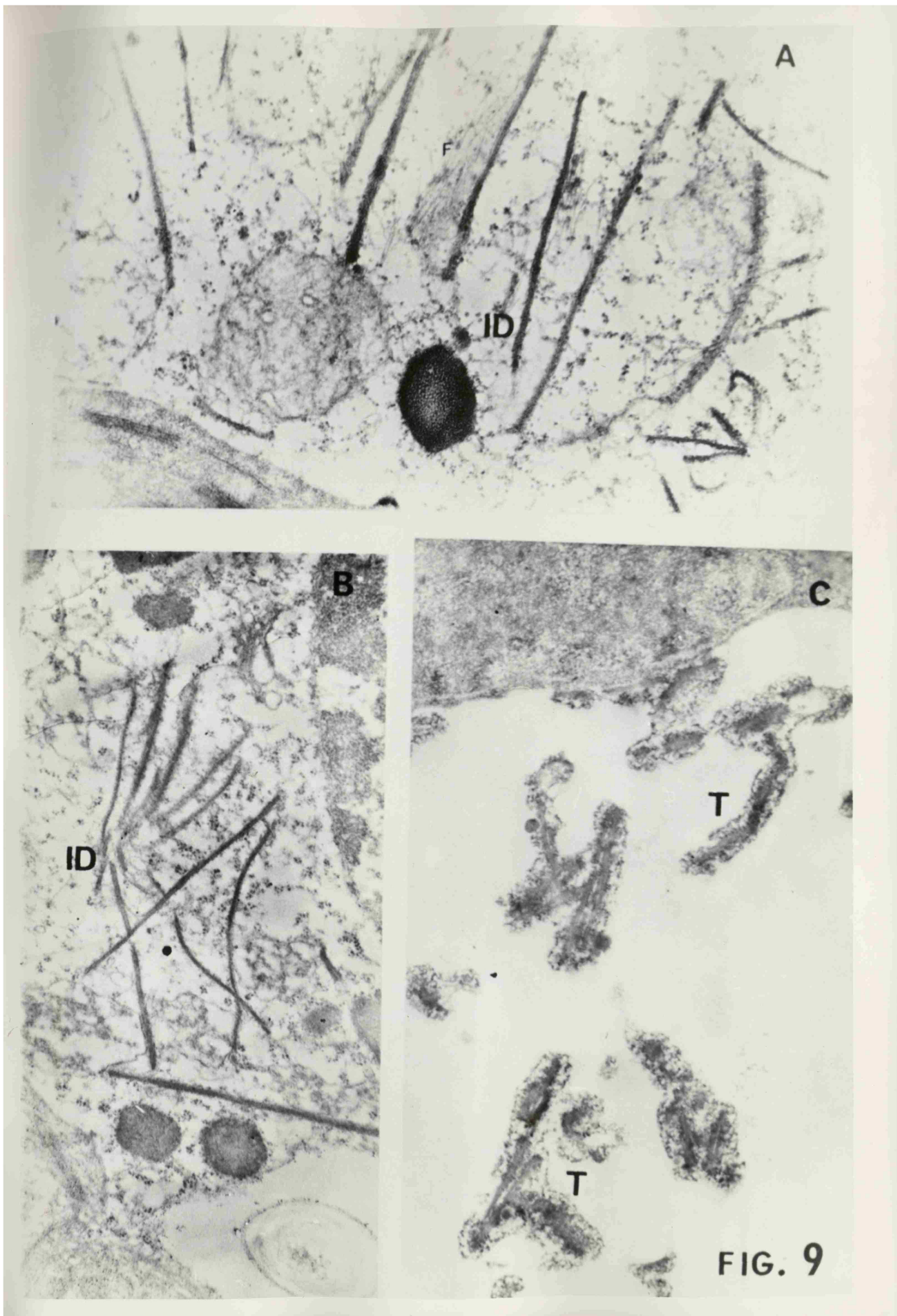


FIG. 8



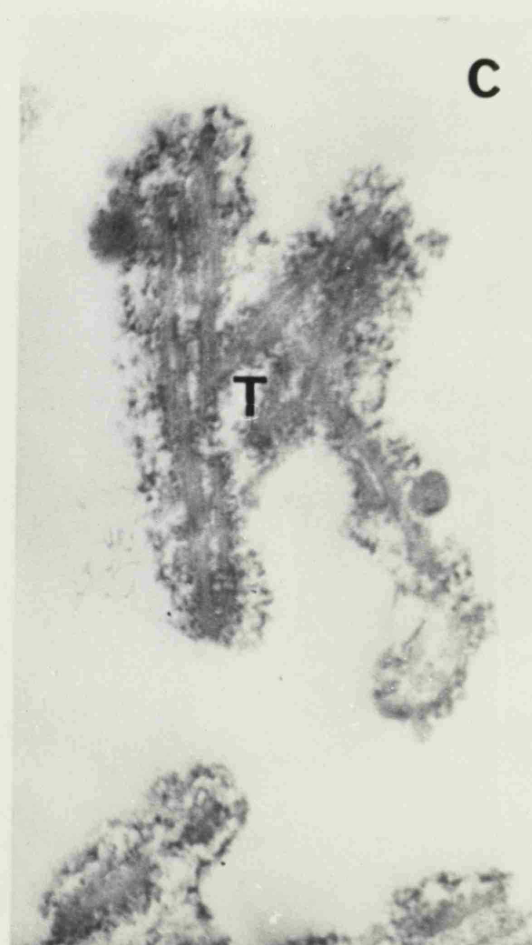
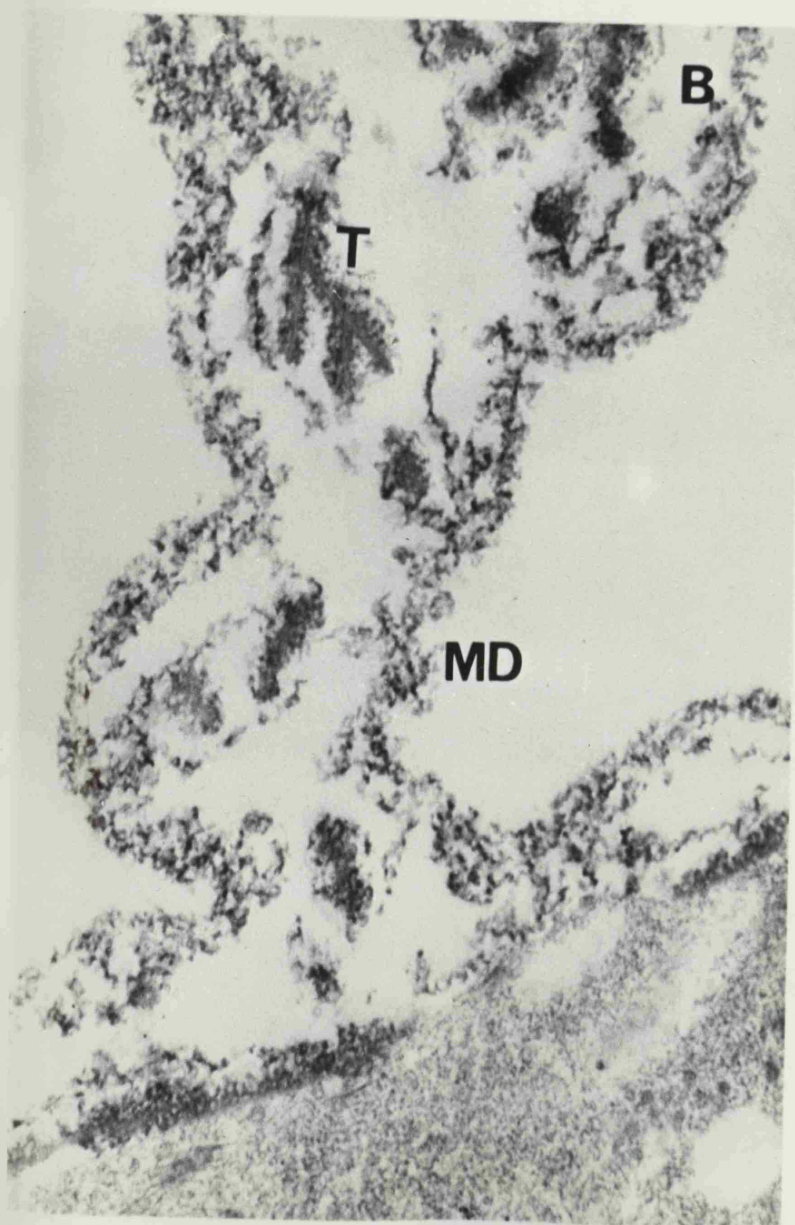
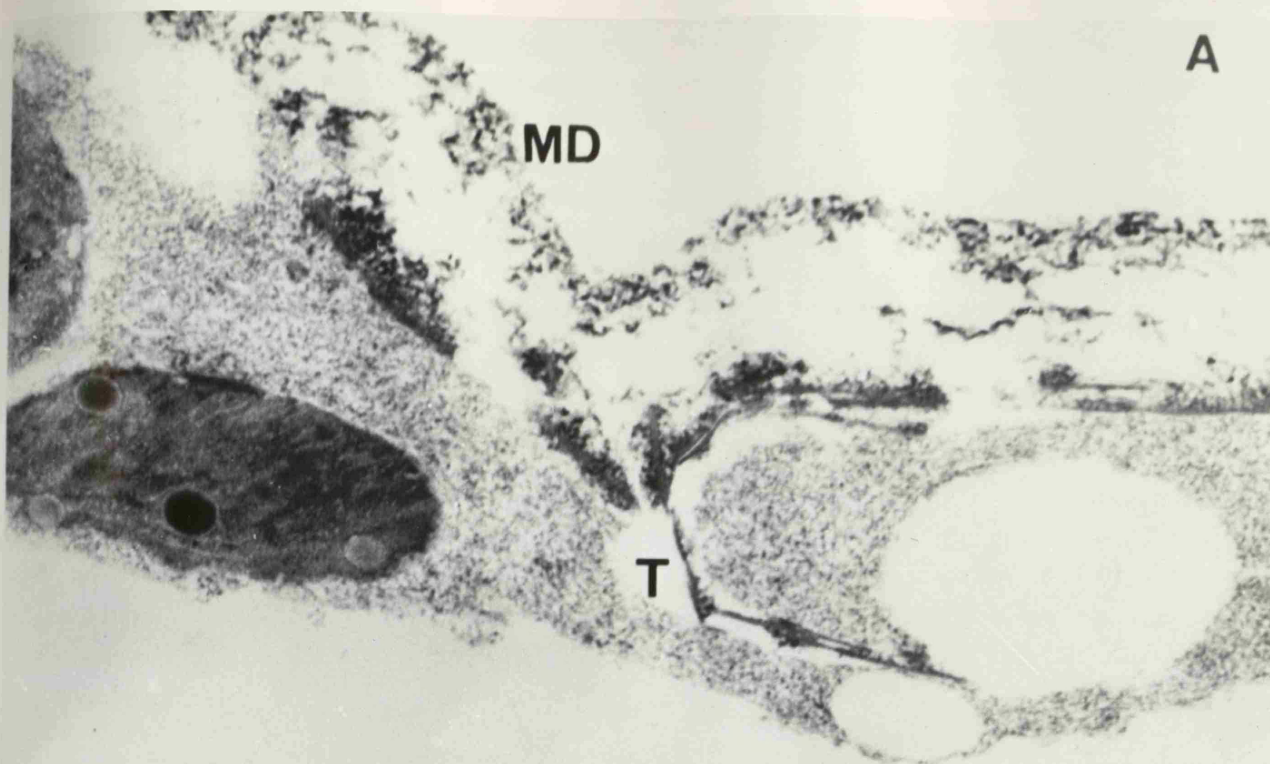
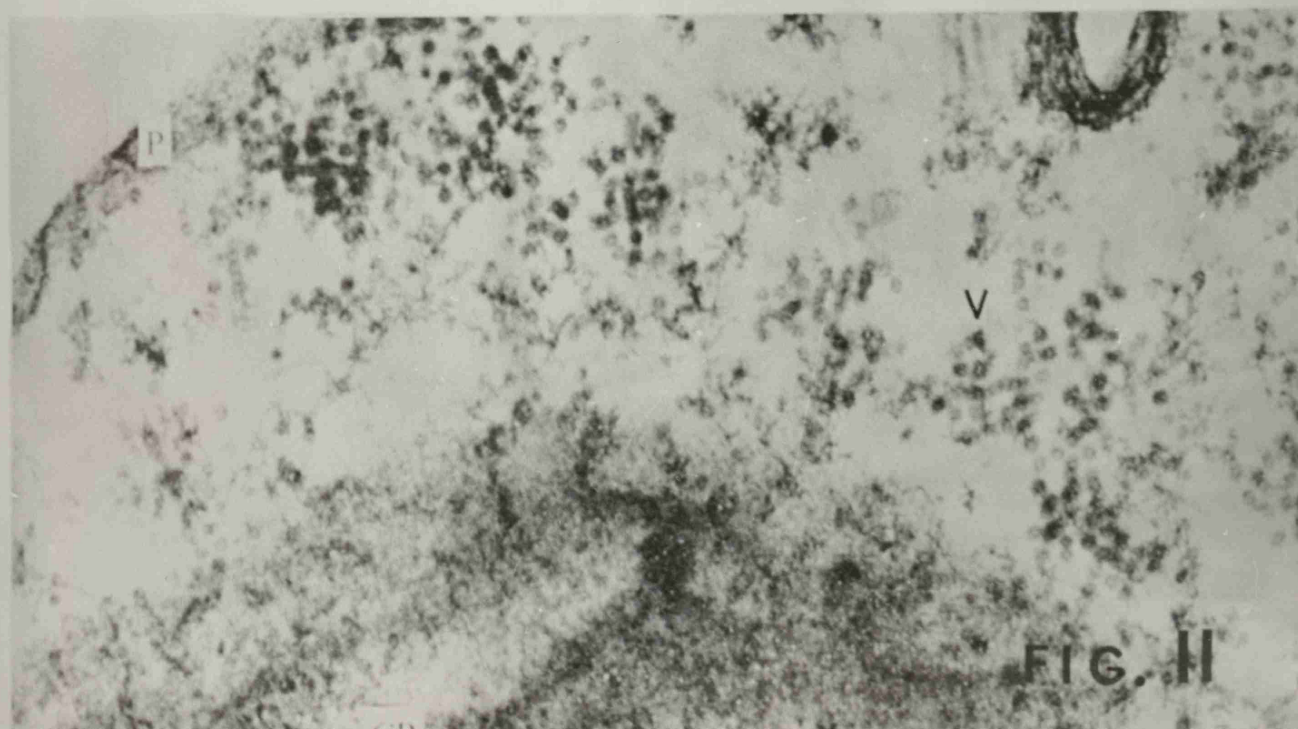
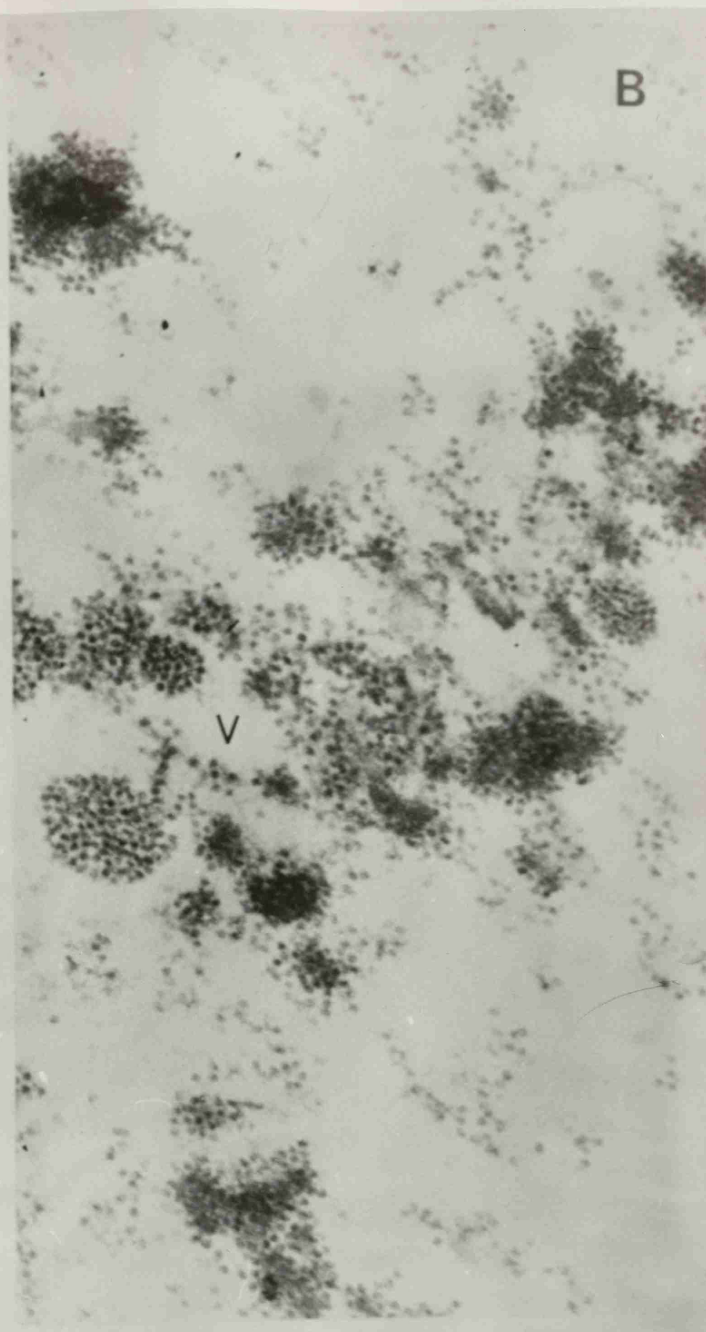
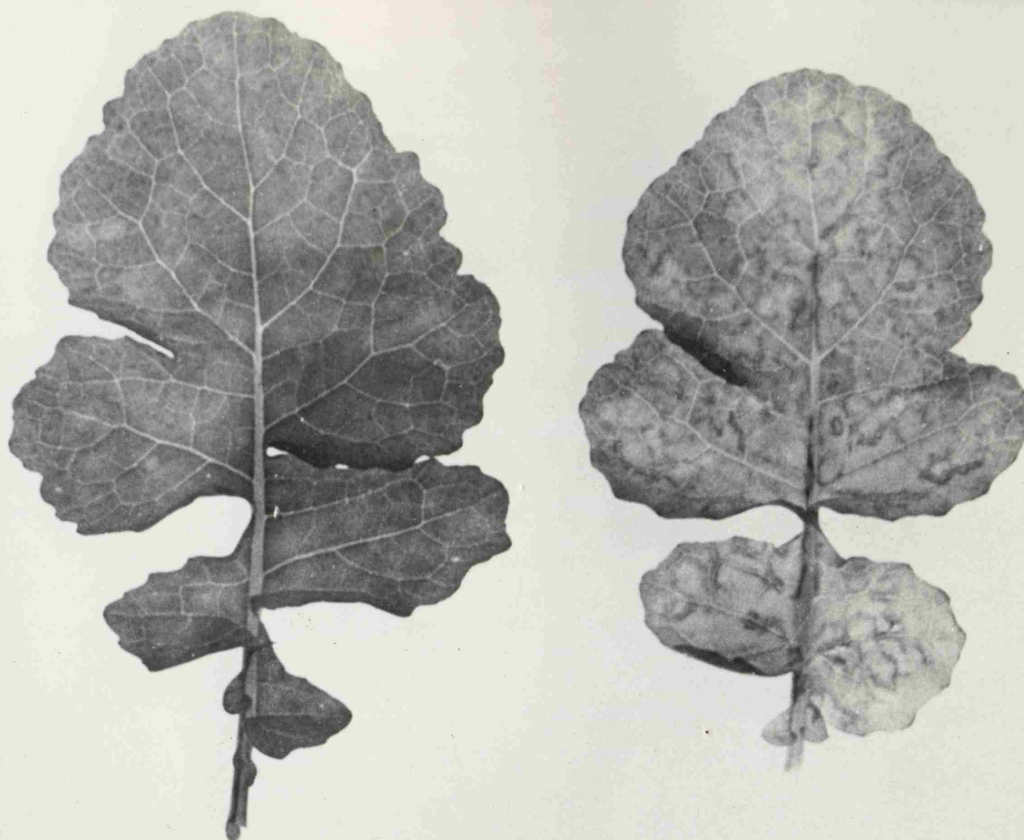


FIG. 10



A



B

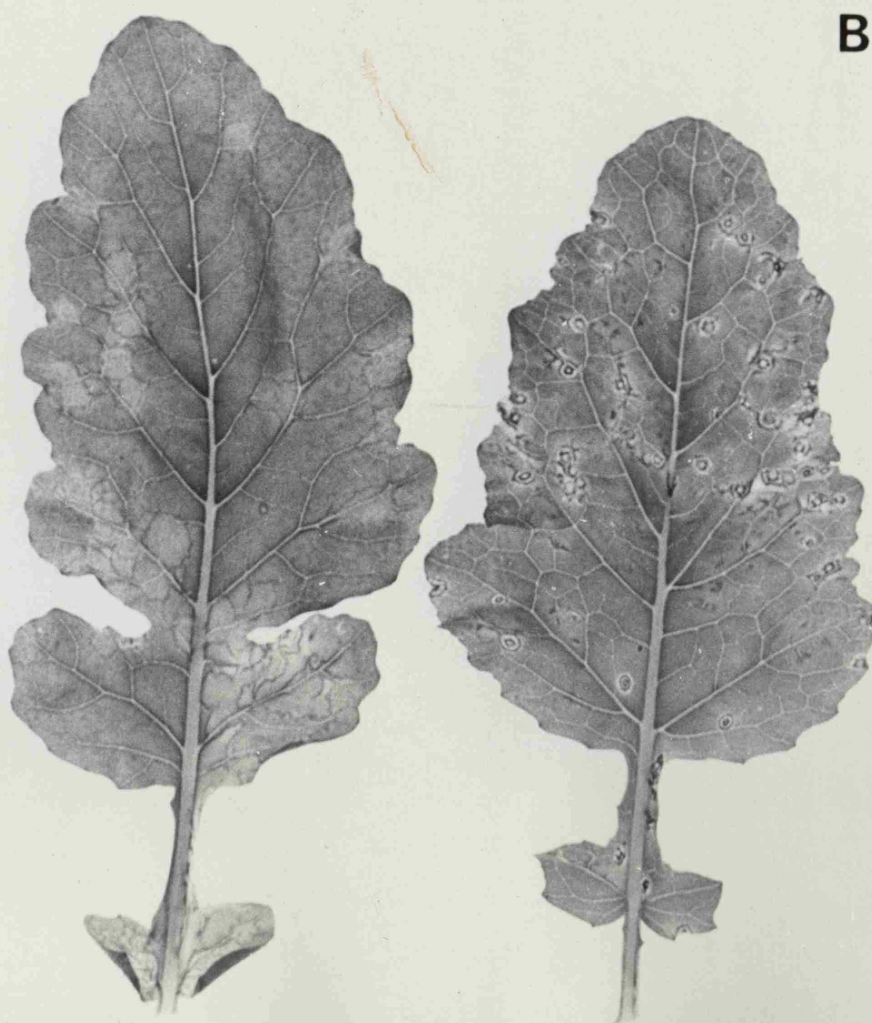


FIG. 12

A



B



C

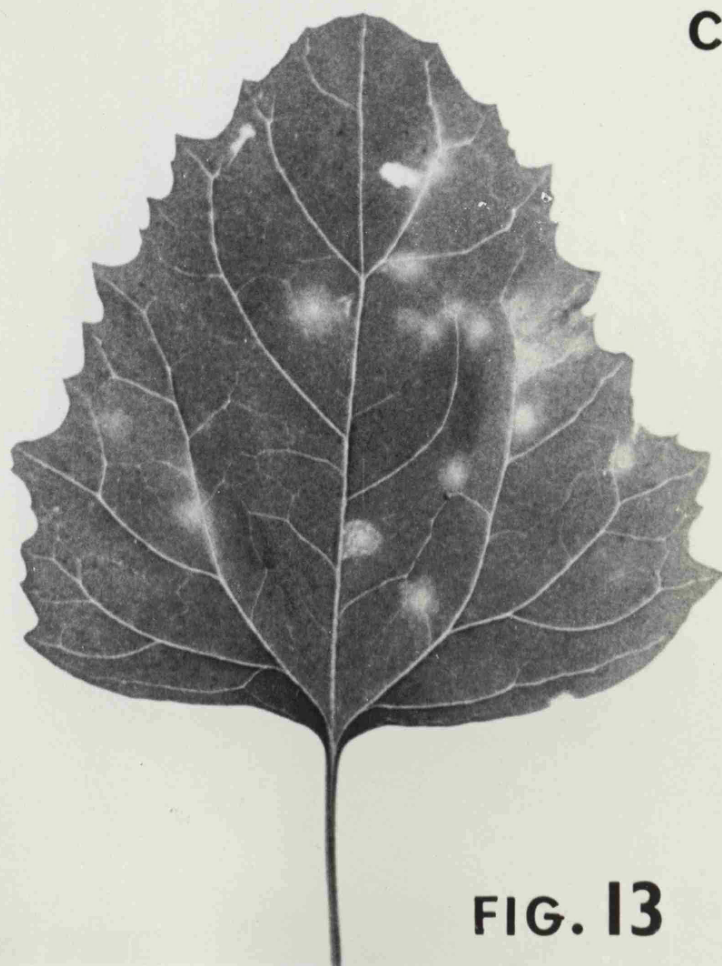


FIG. 13

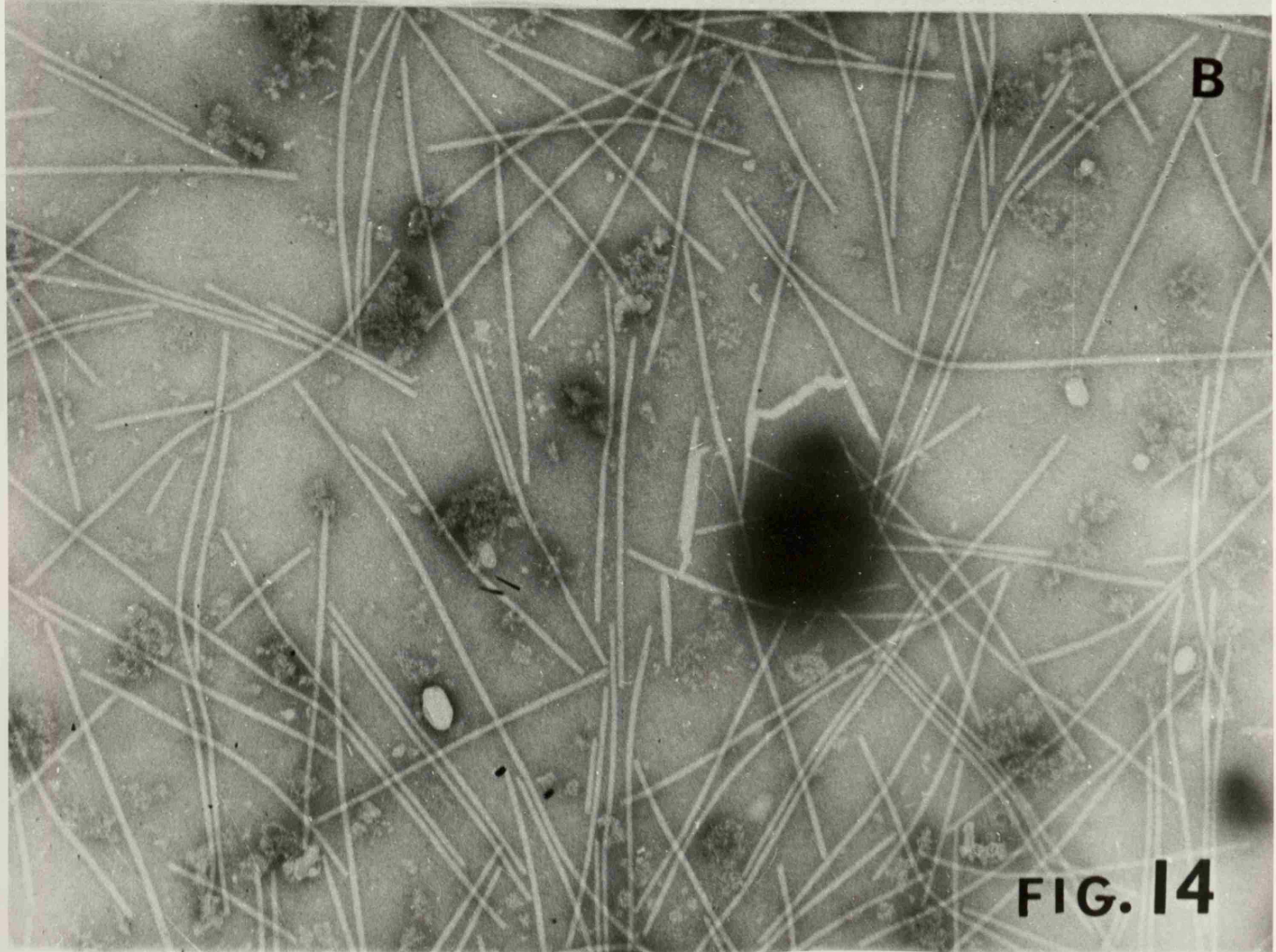
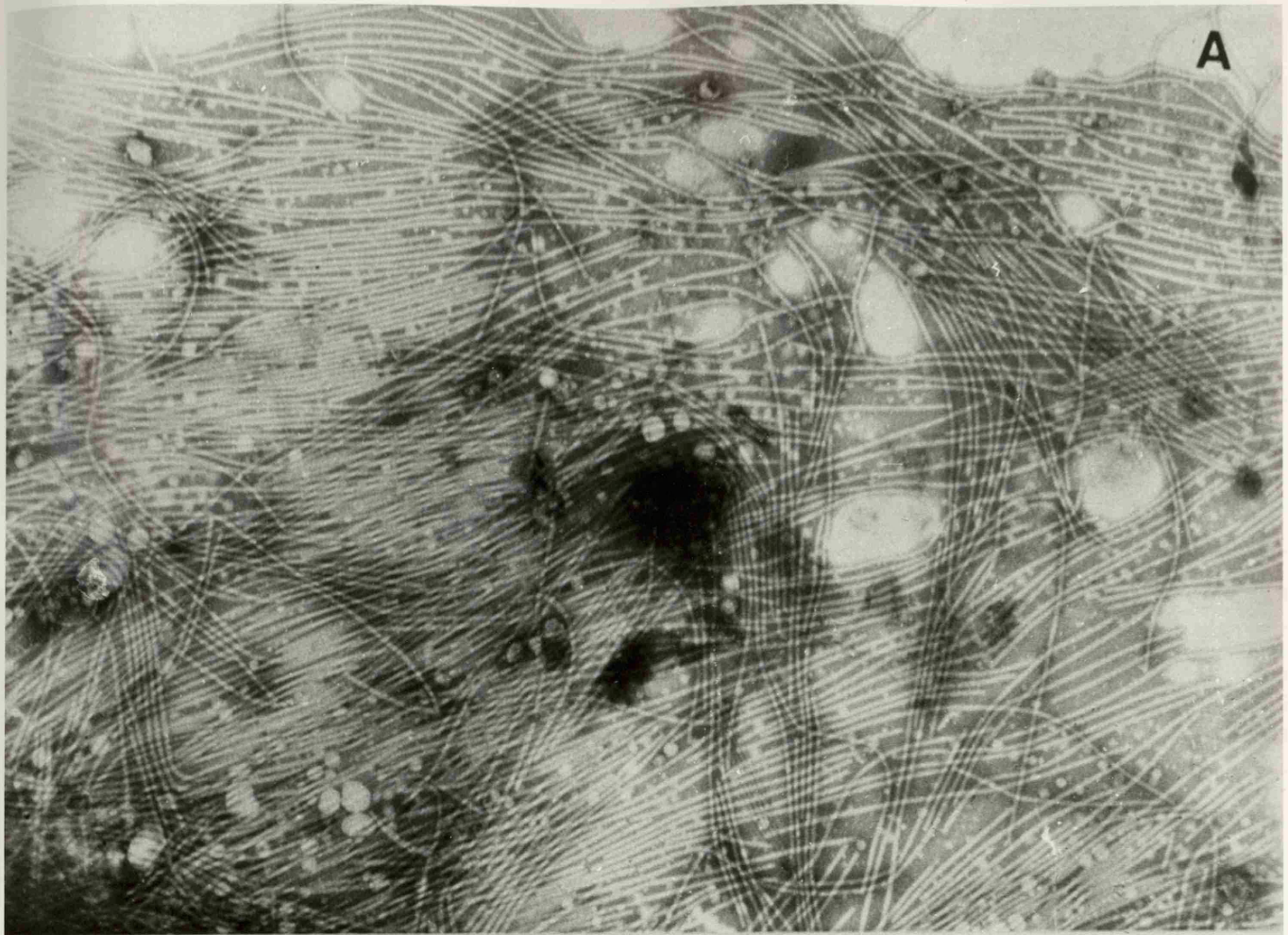
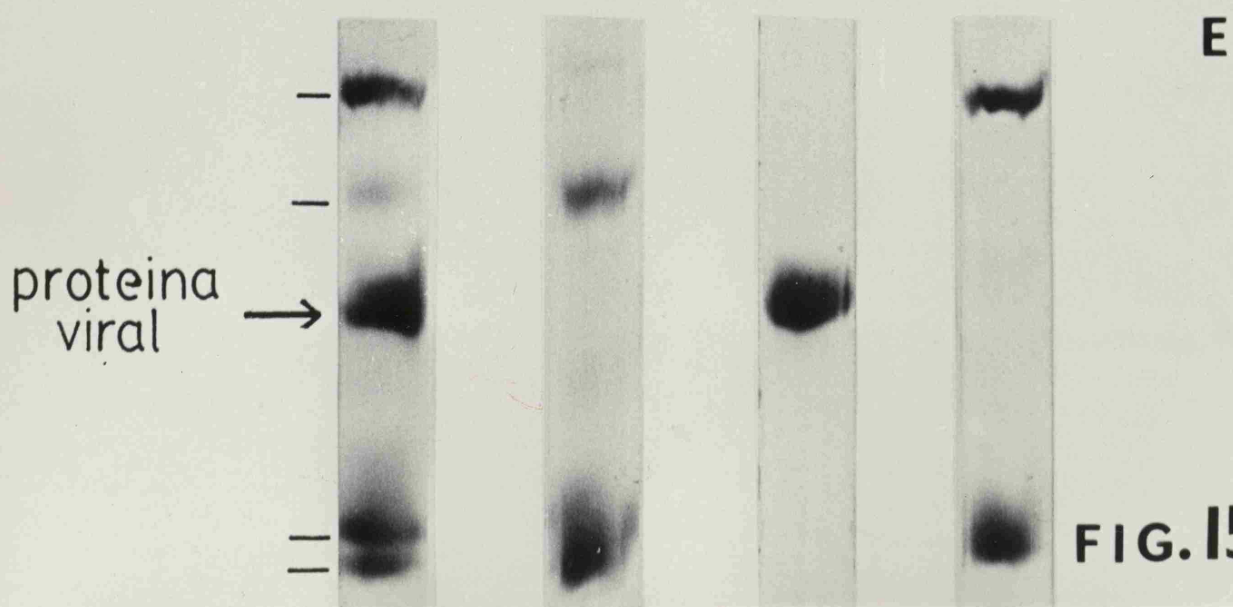
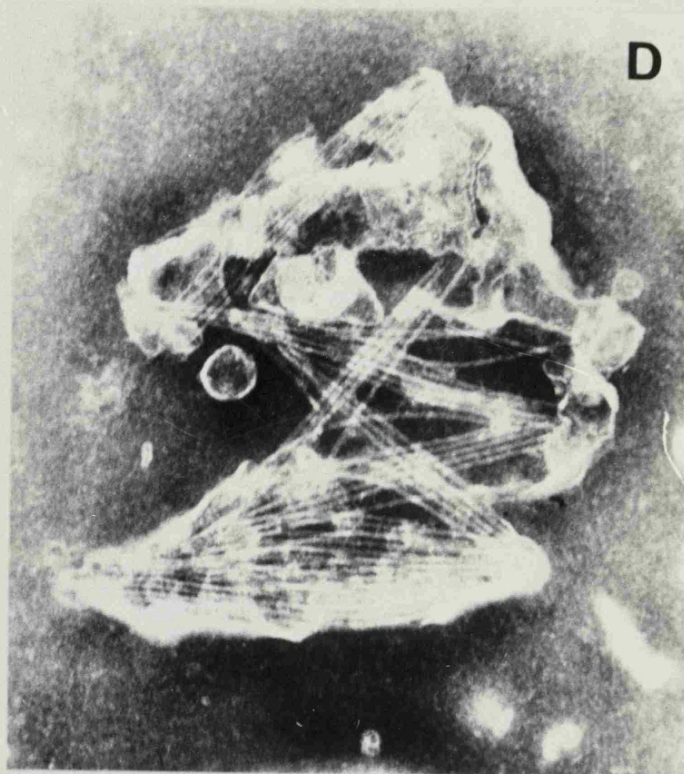
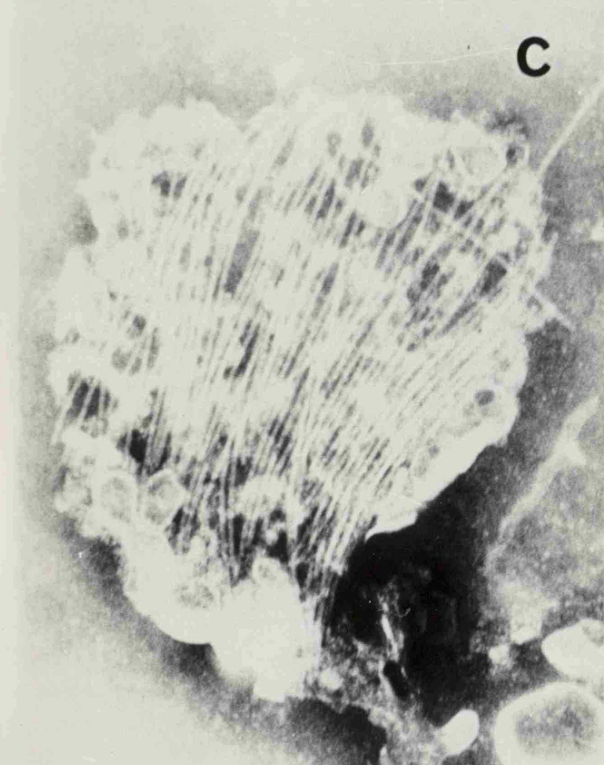
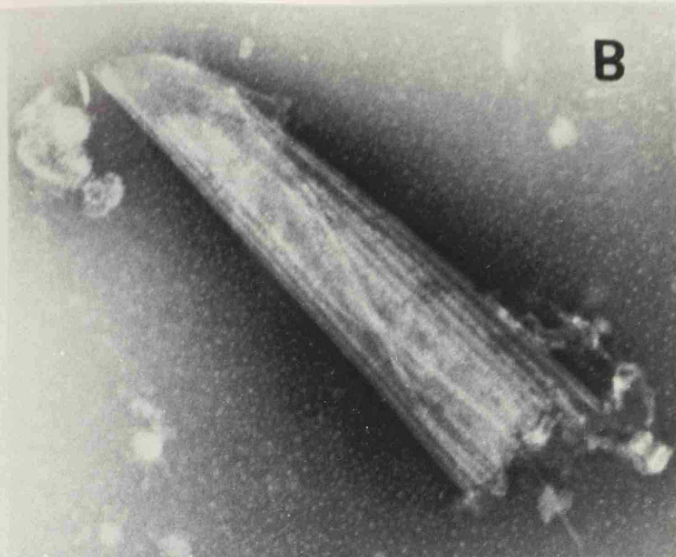
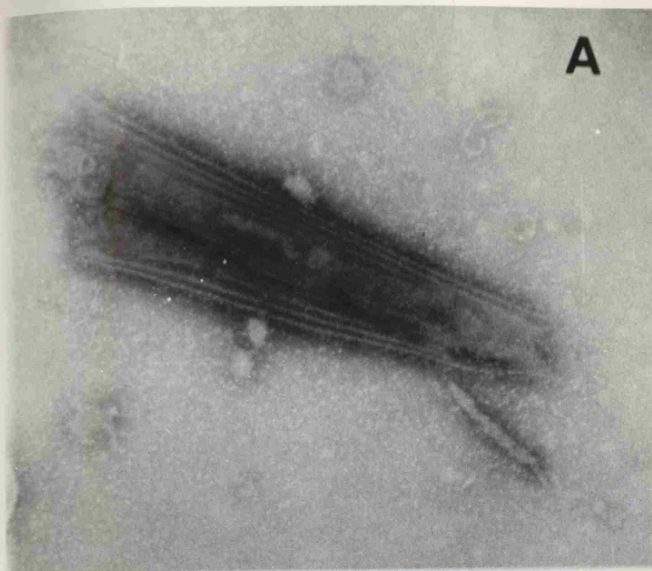


FIG. 14



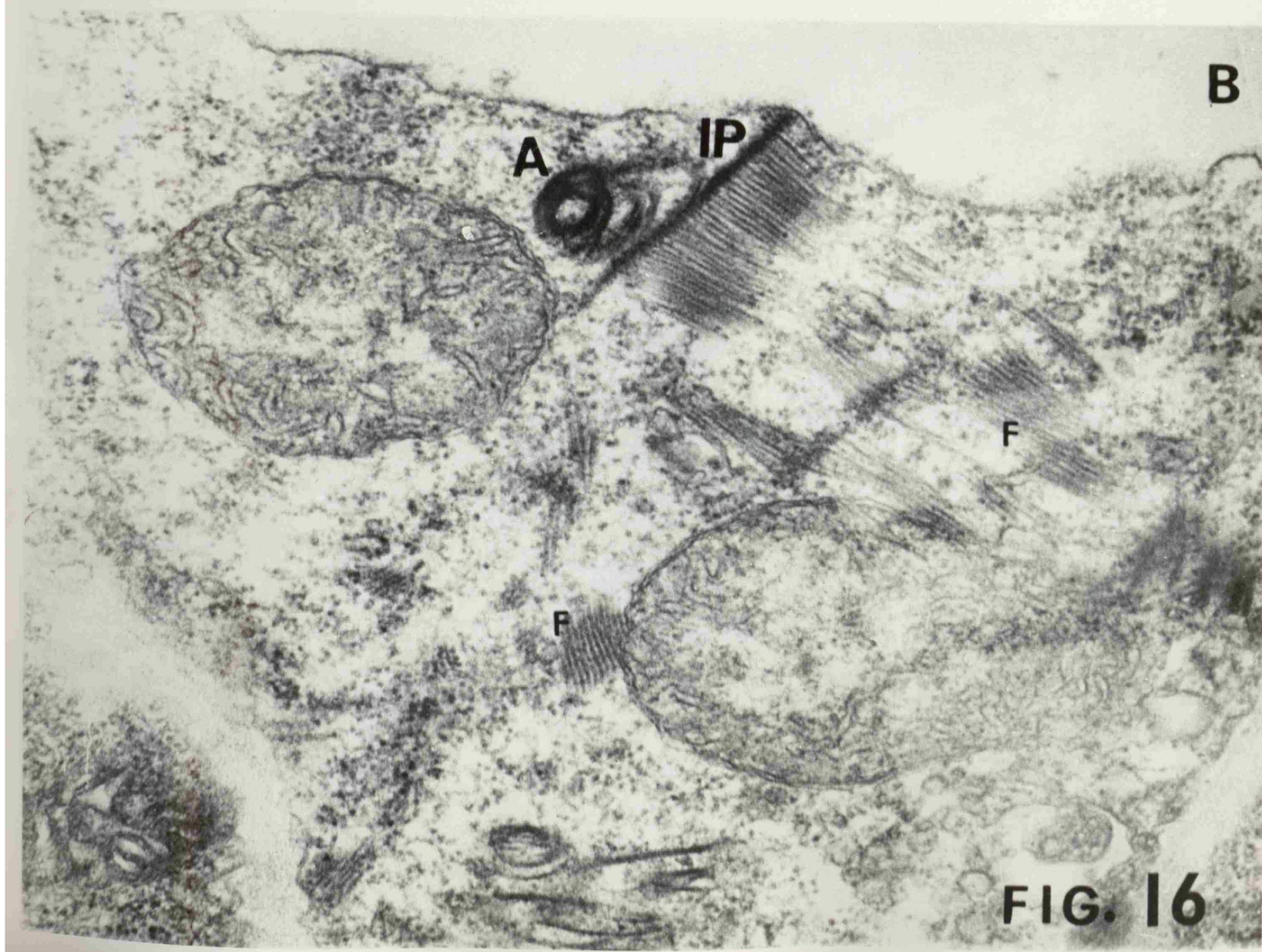
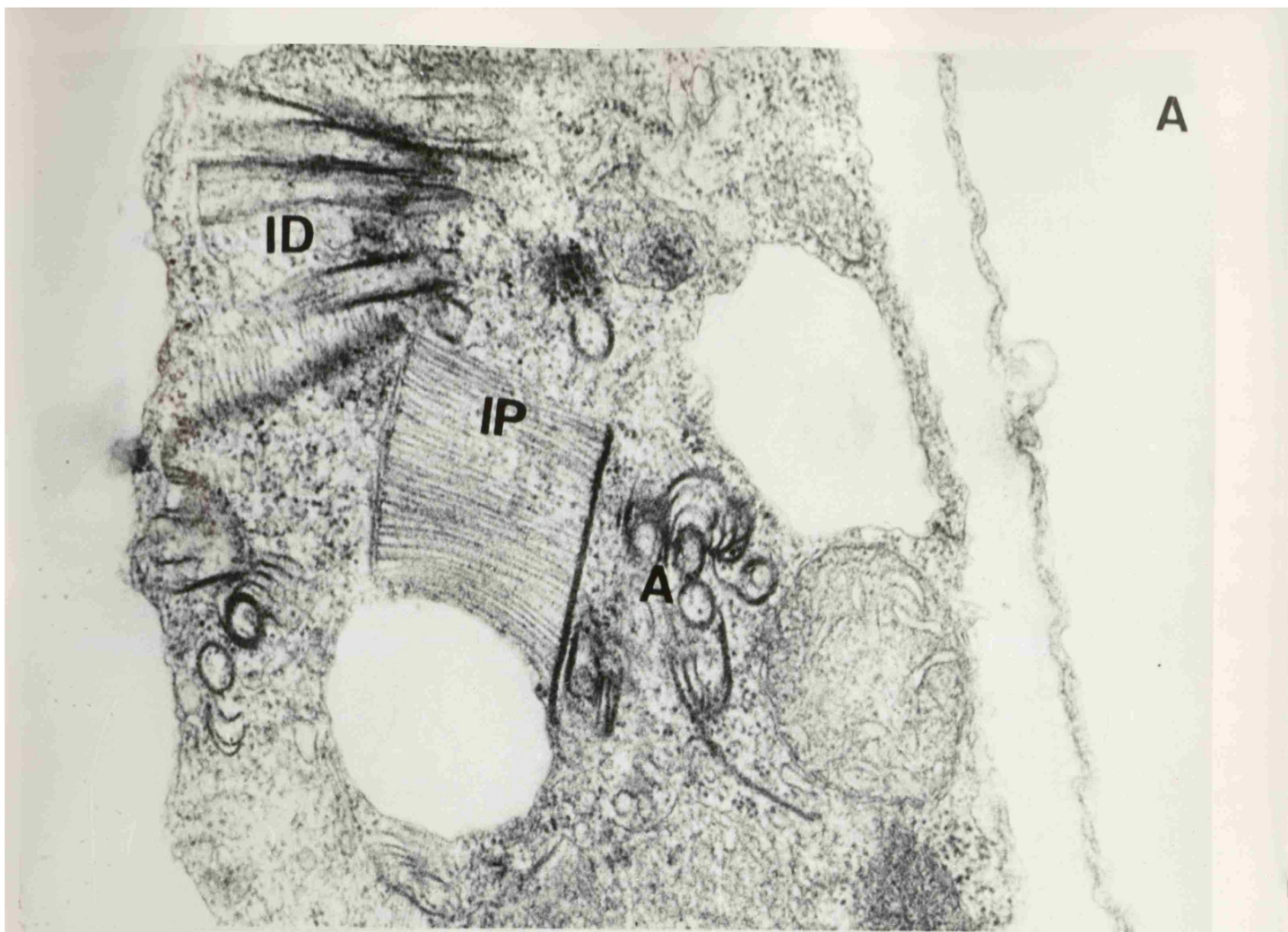


FIG. 16

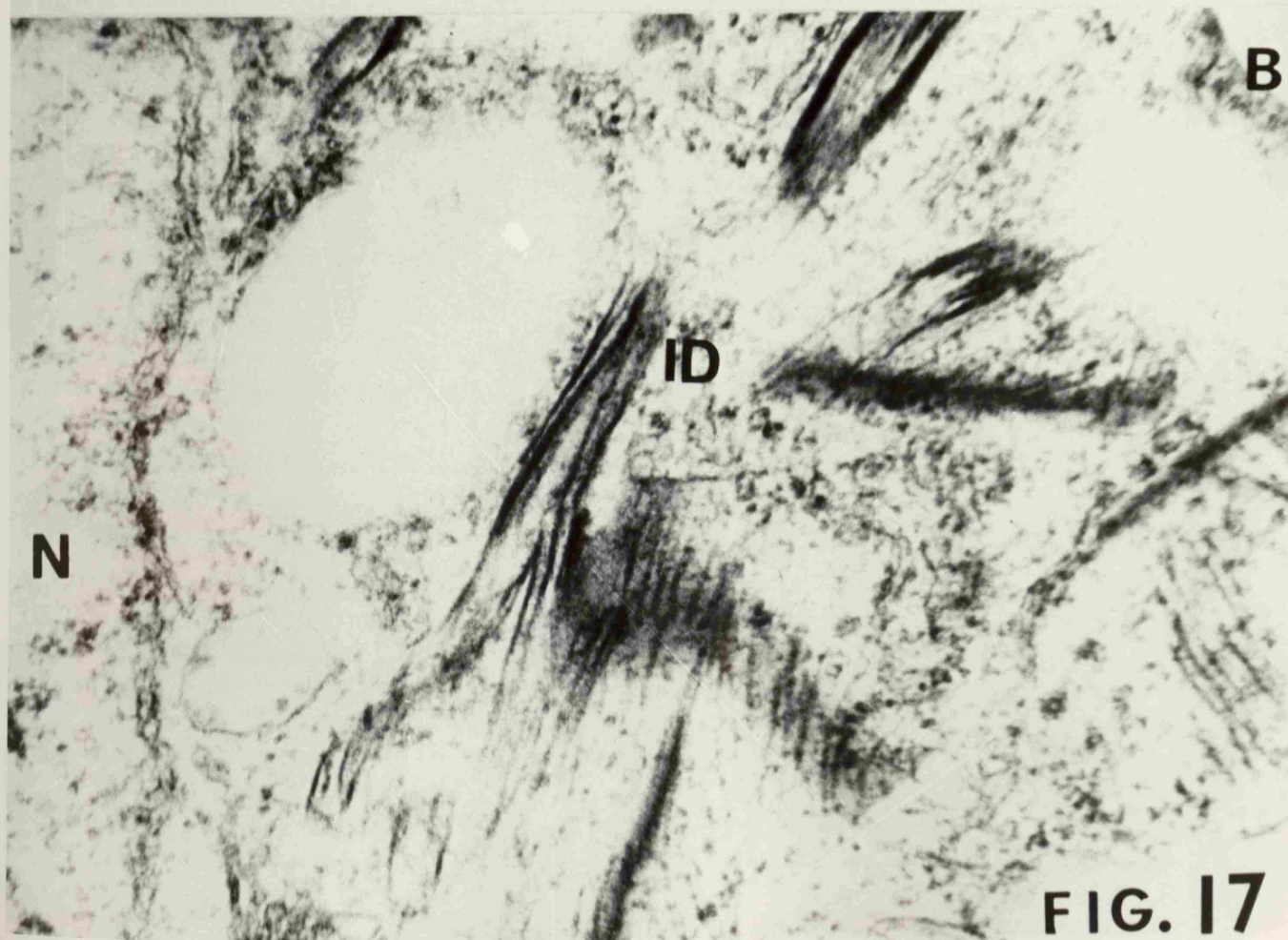
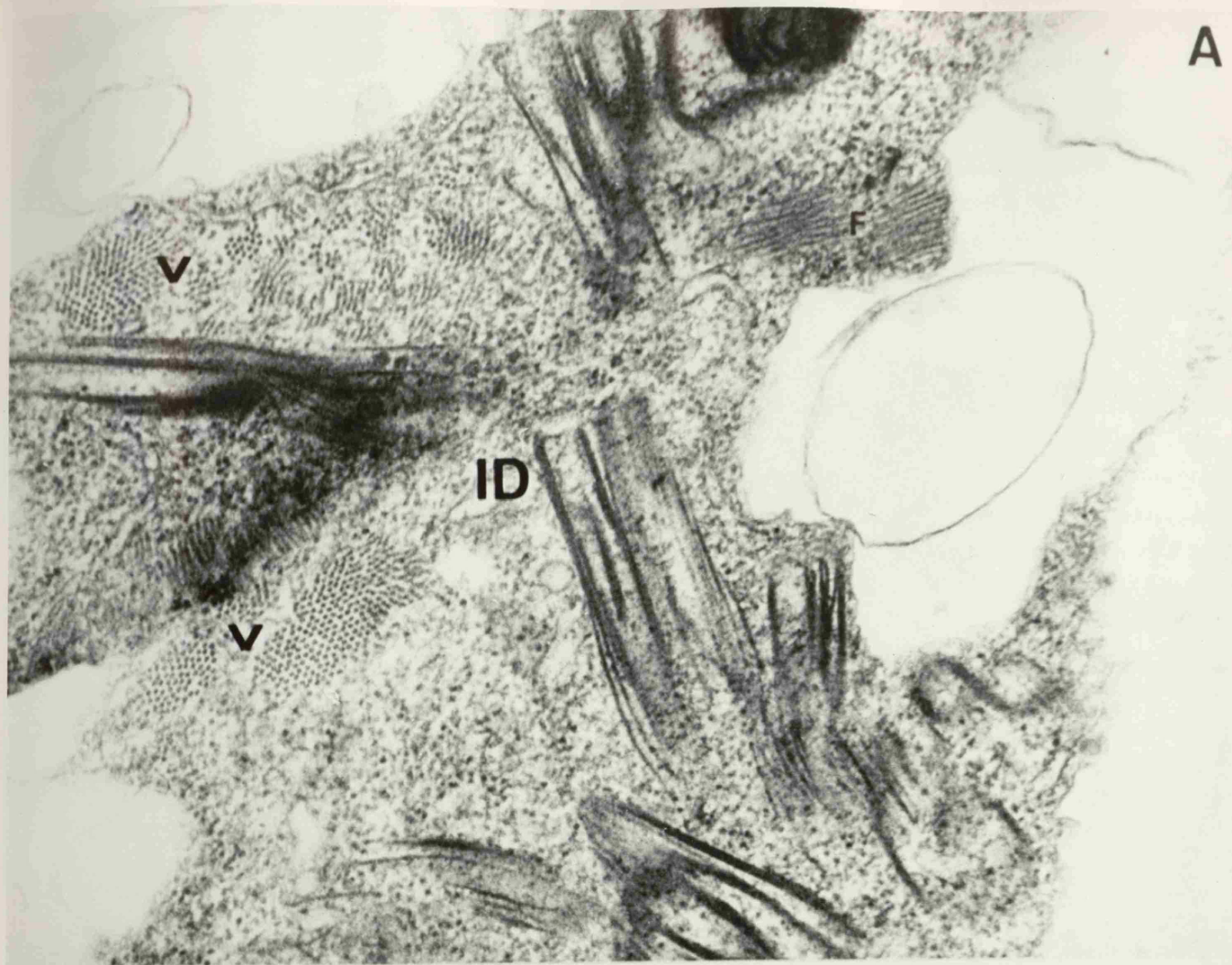


FIG. 17

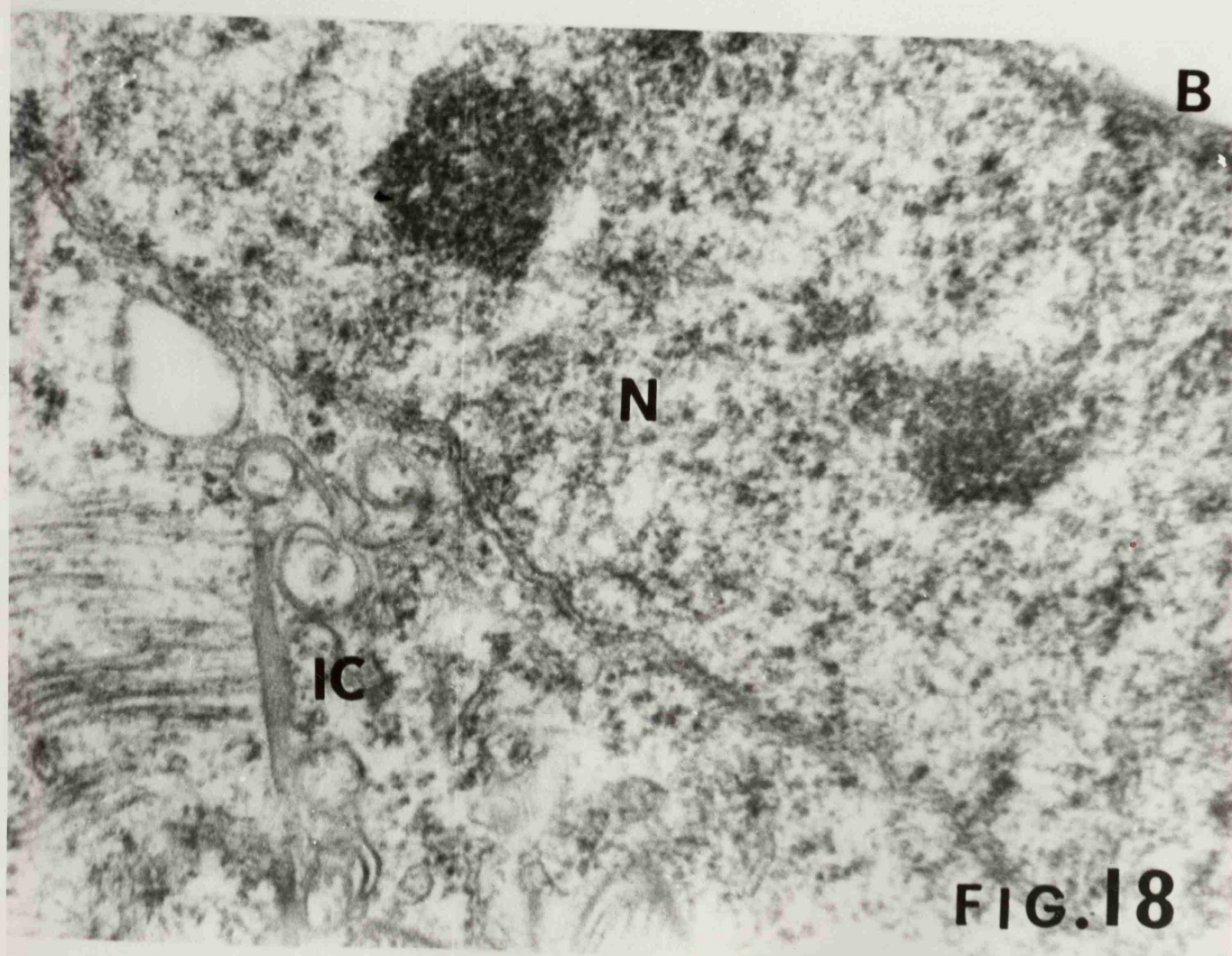
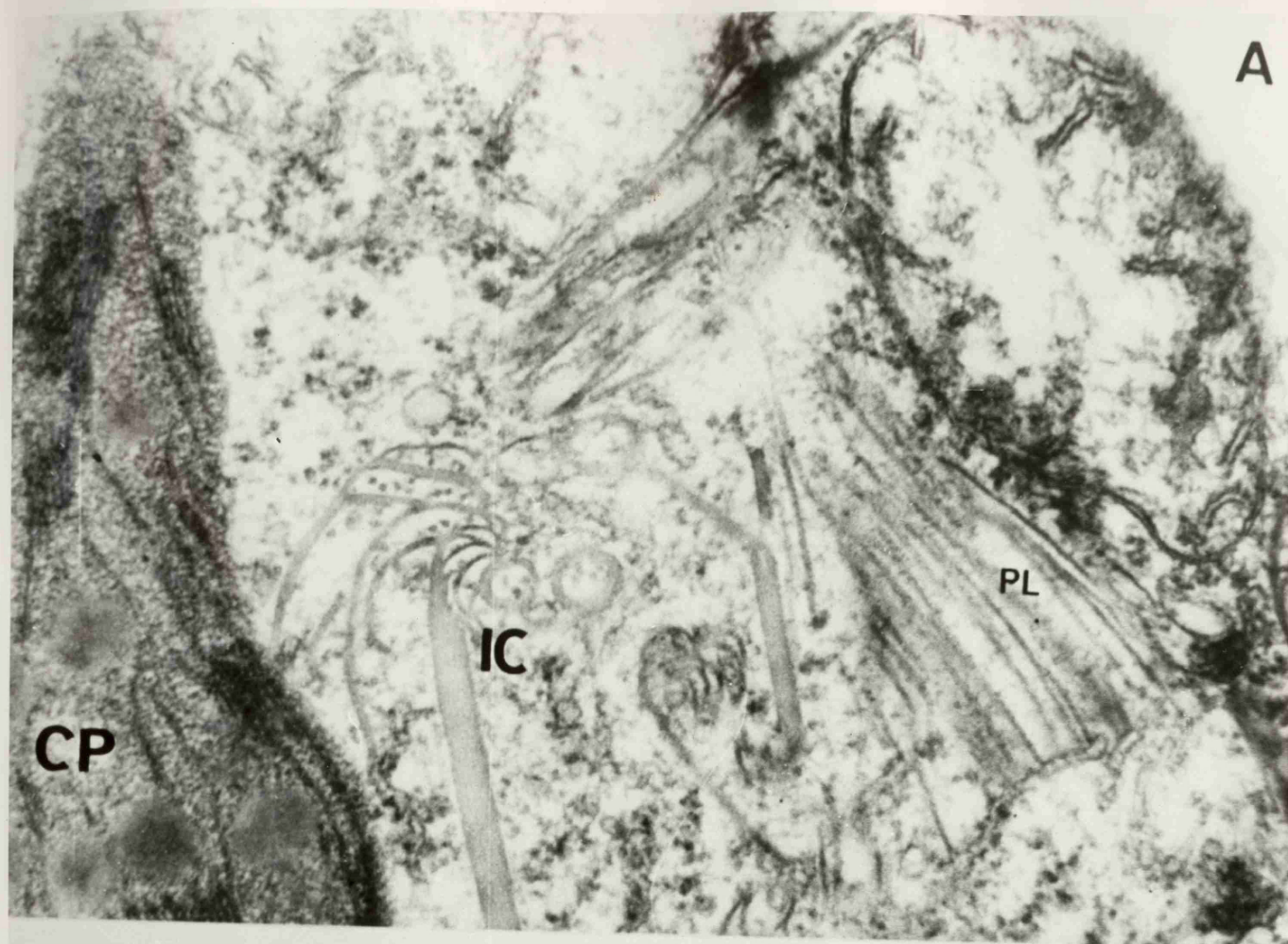
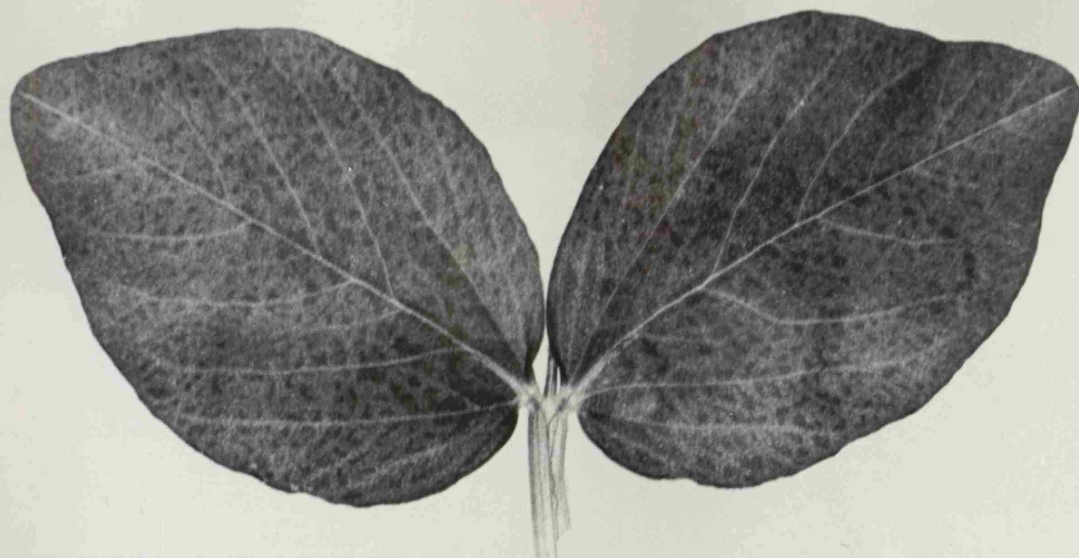


FIG. 18



A



B



C



D



FIG. 19

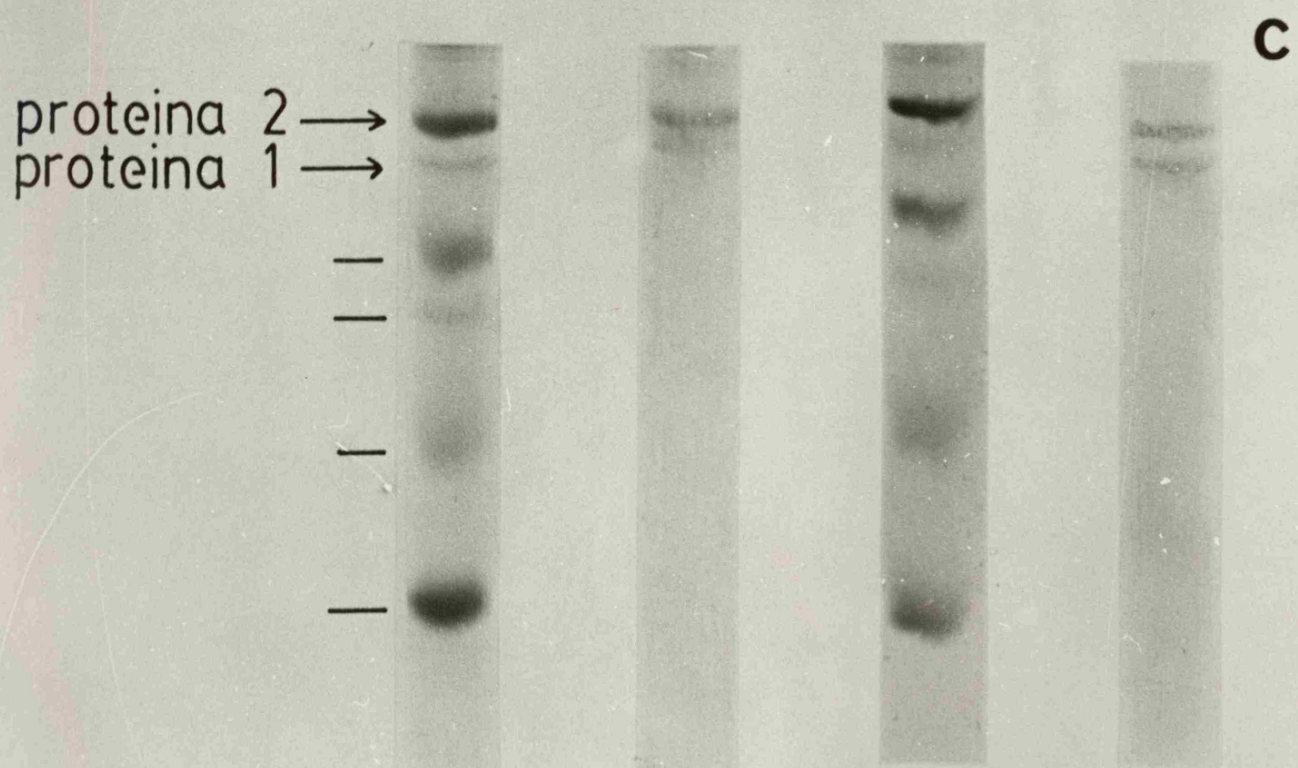
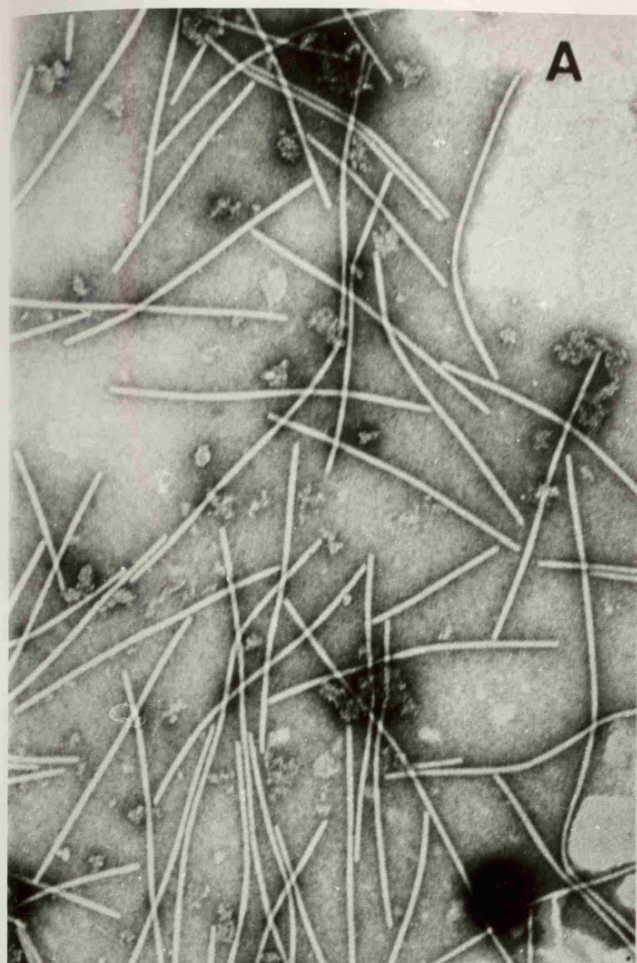


FIG. 20

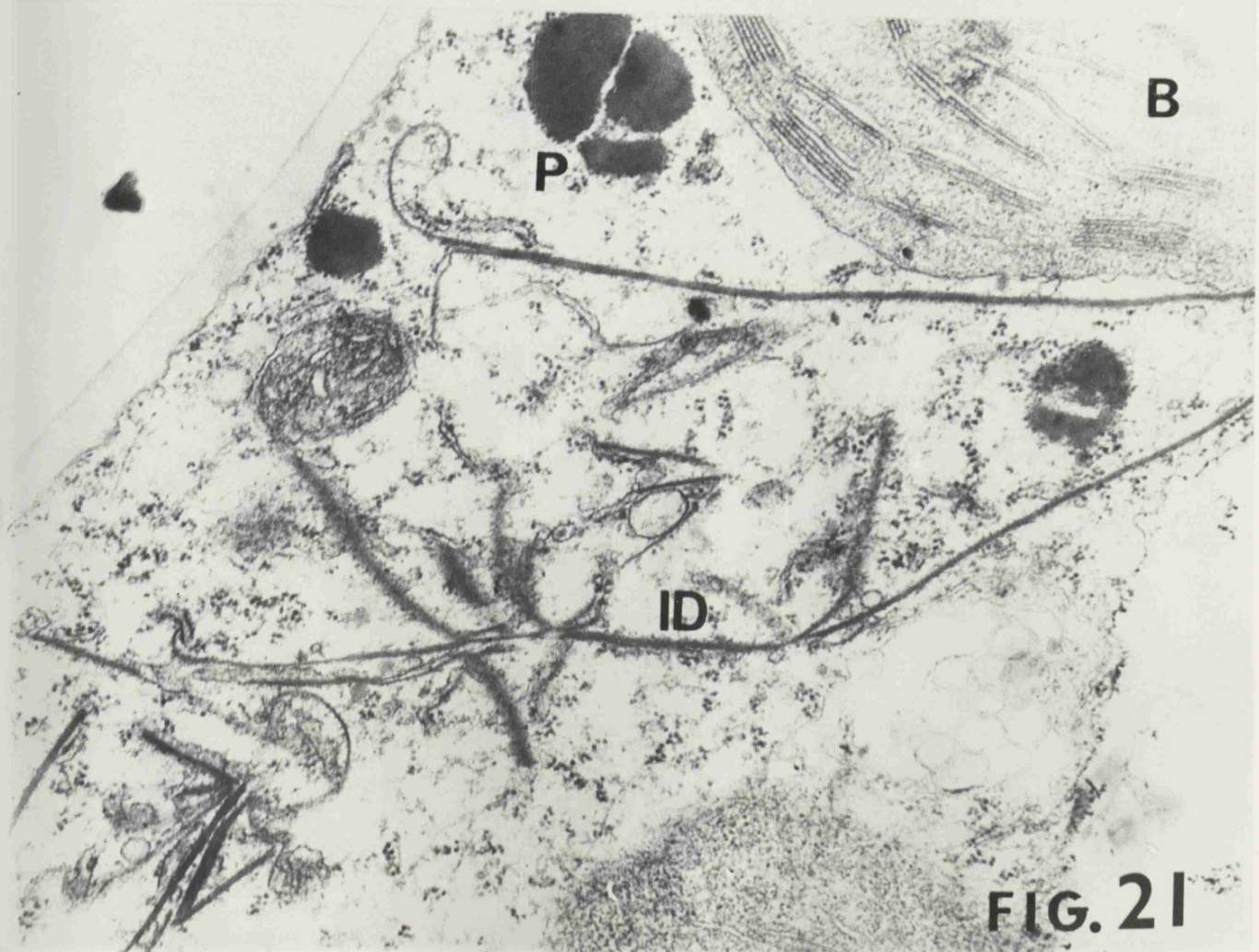
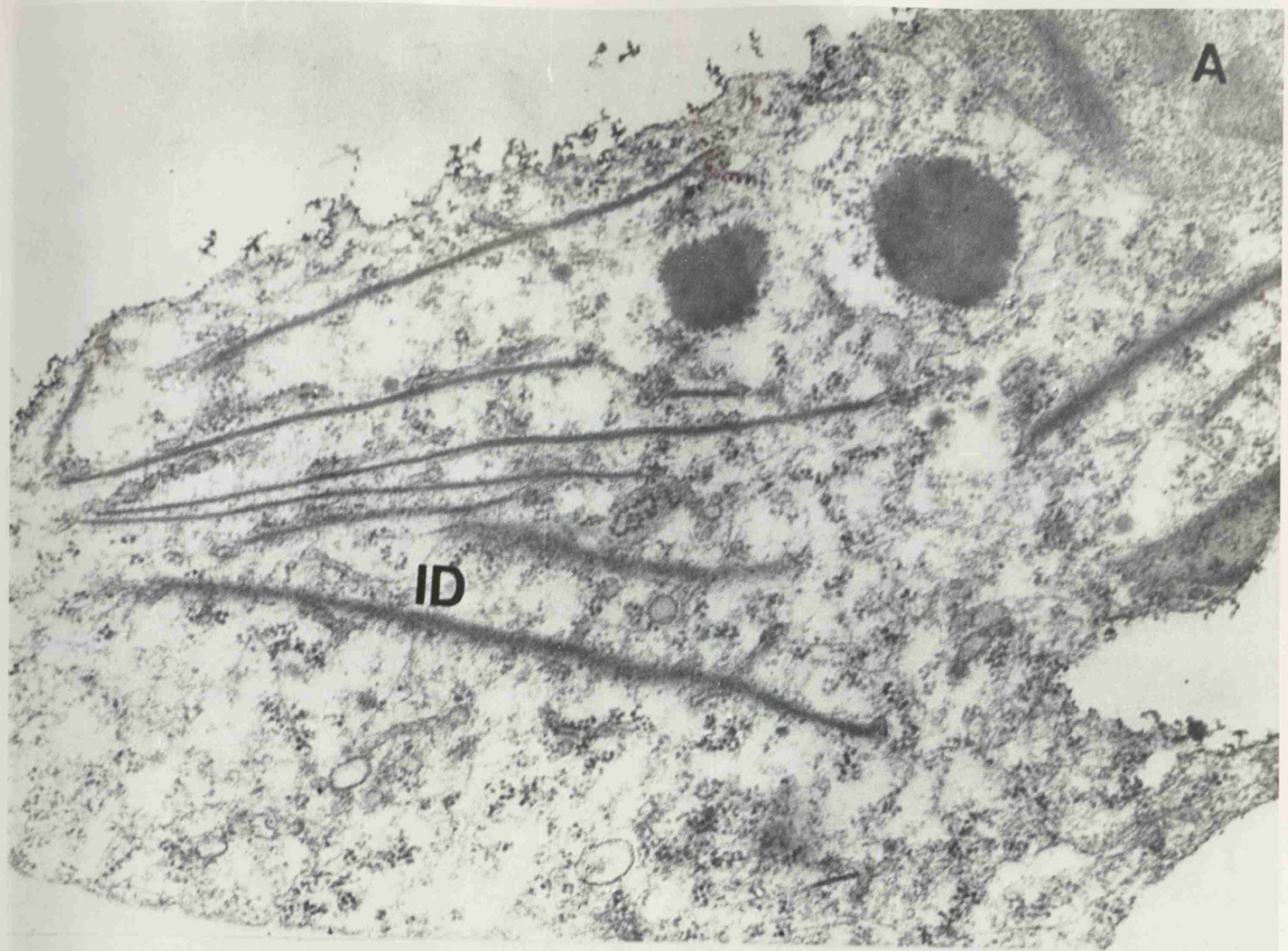
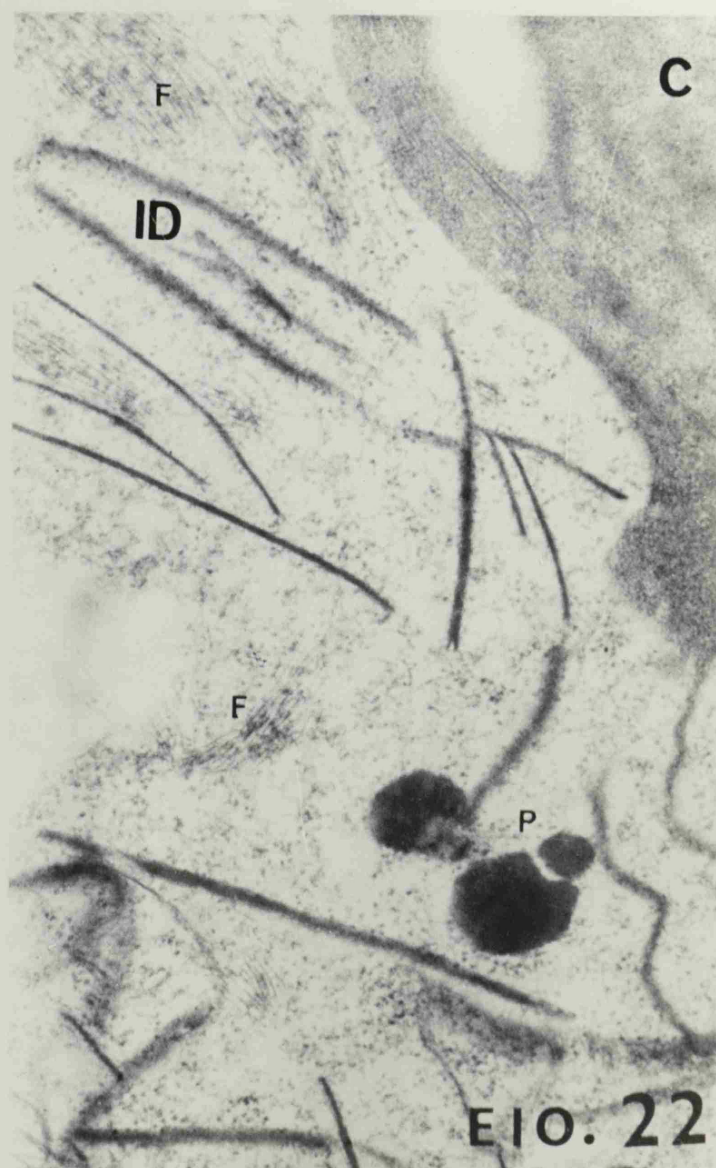
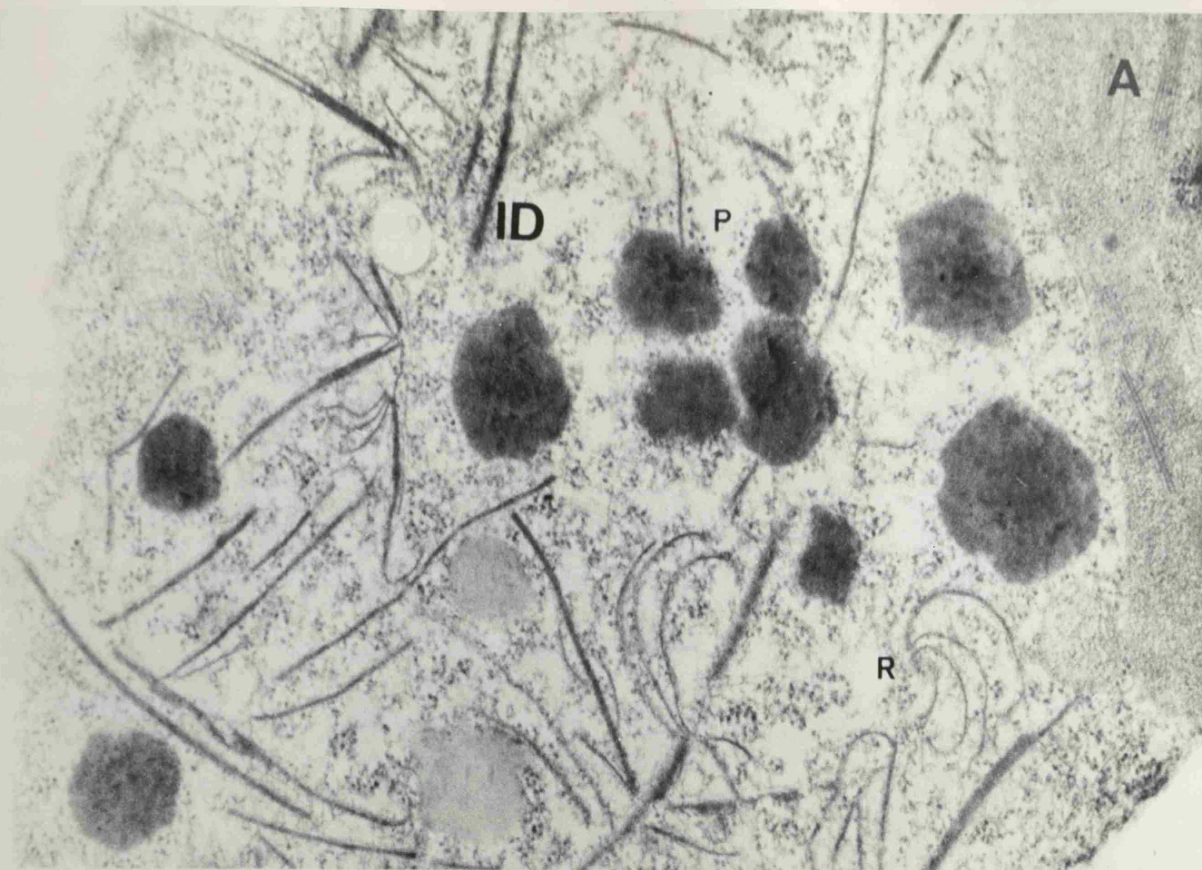


FIG. 21



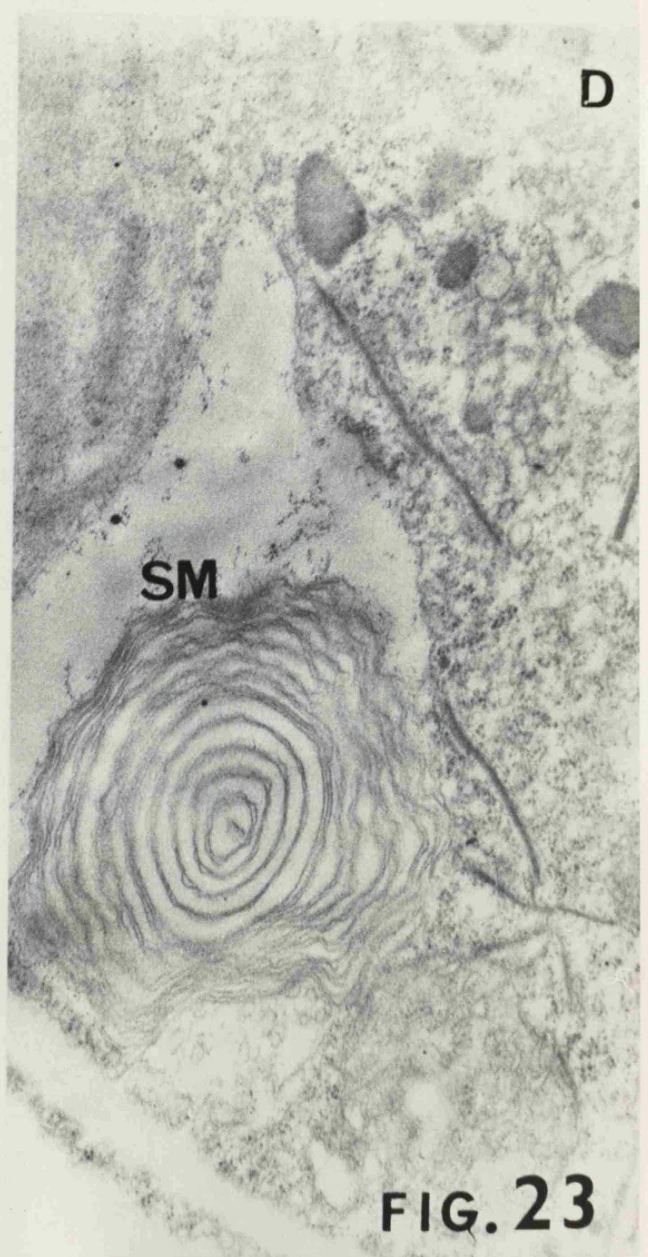
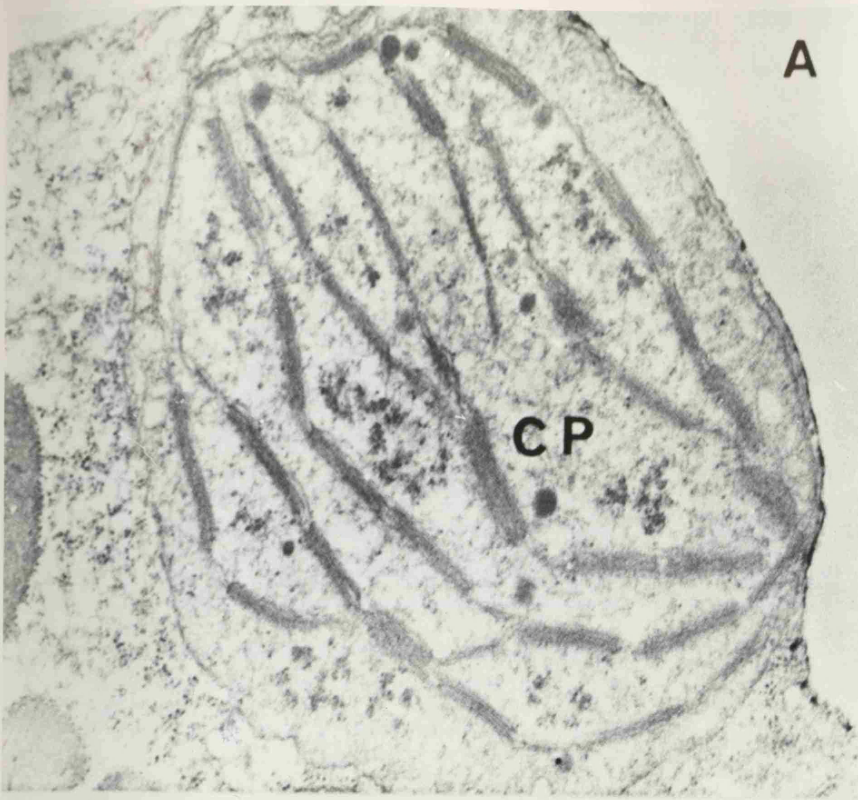
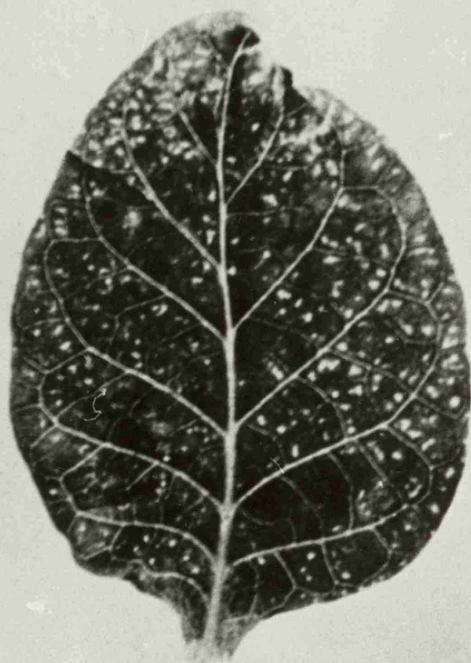
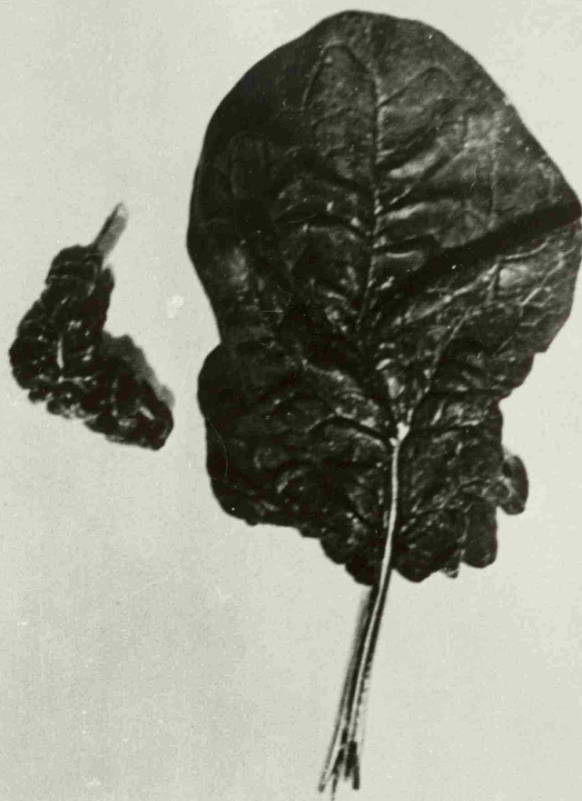


FIG. 23

A



B



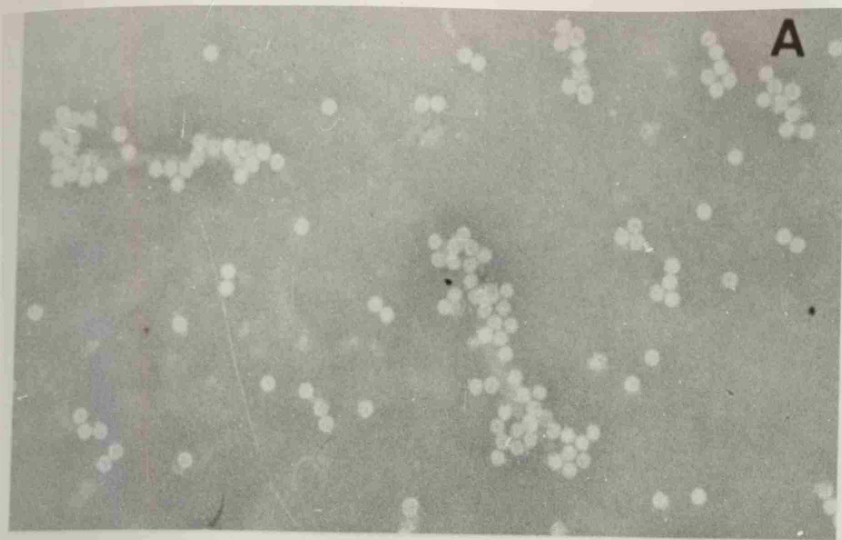
C



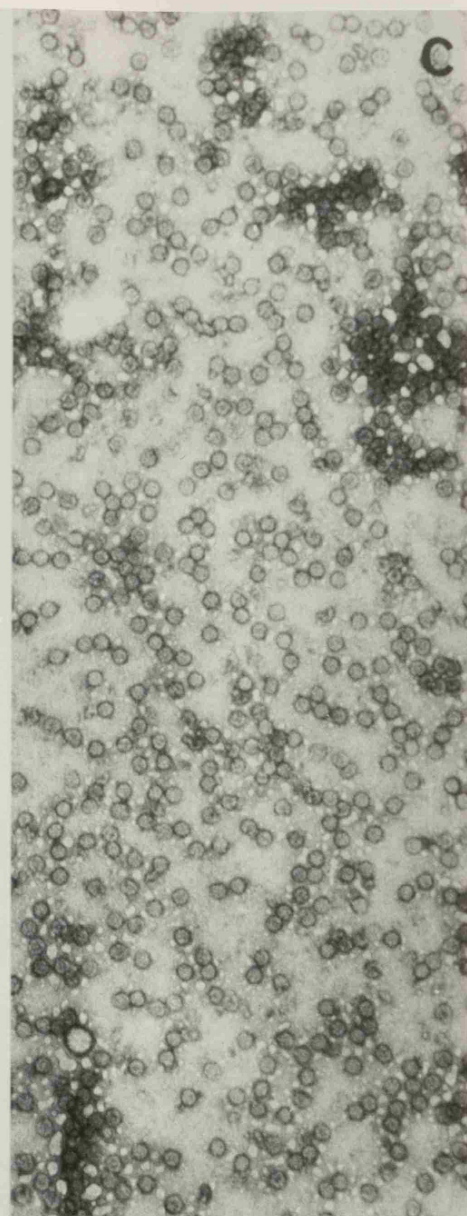
D



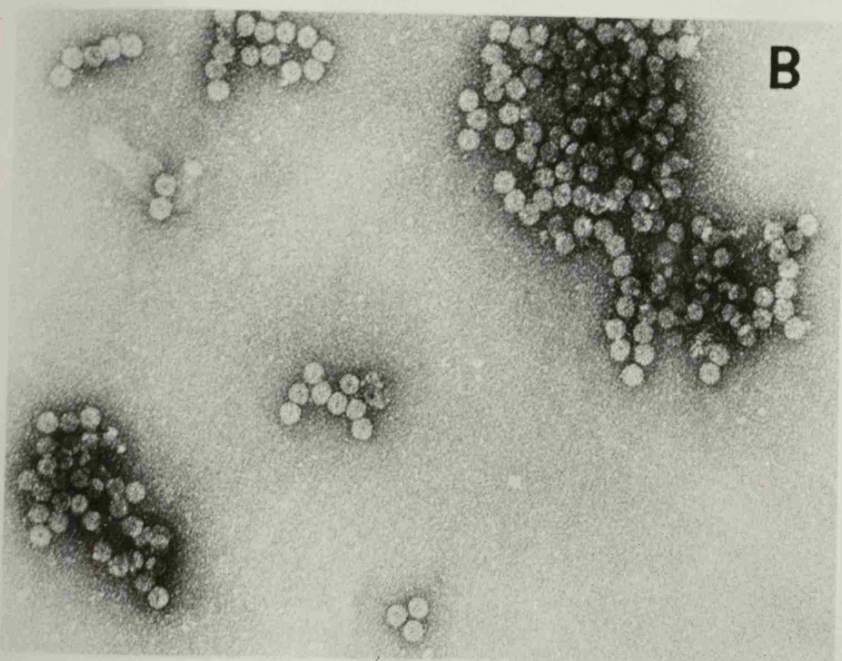
FIG. 24



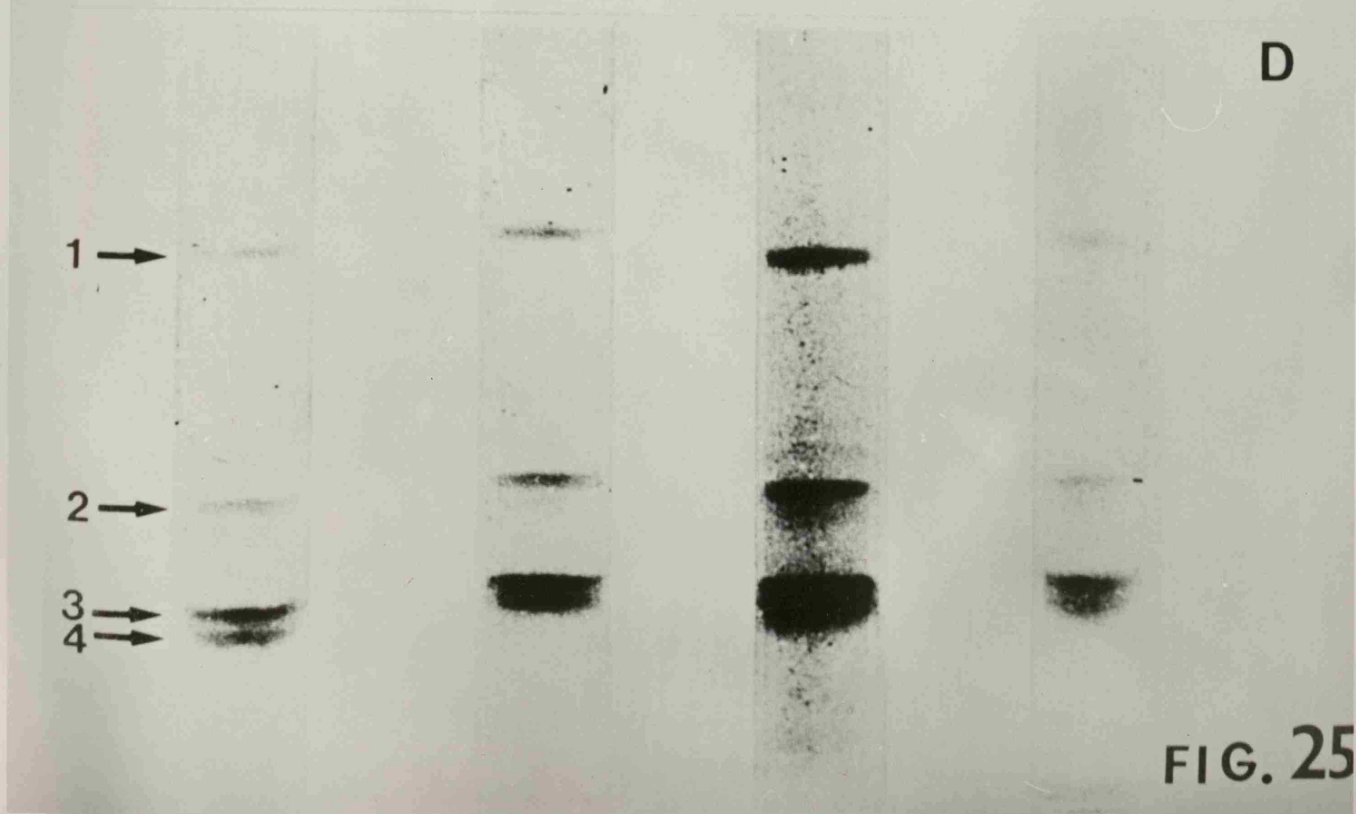
A



C



B



D

FIG. 25

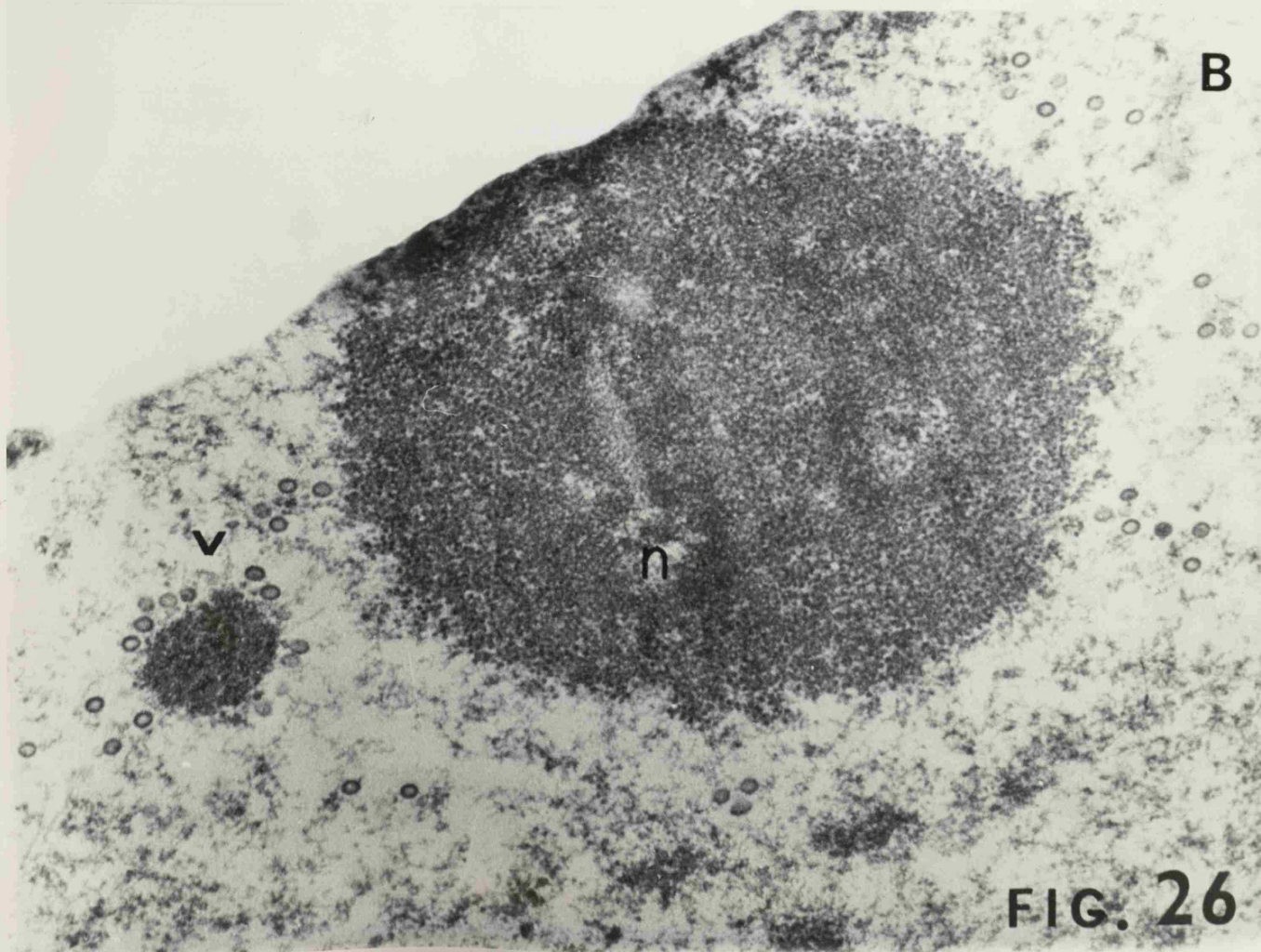
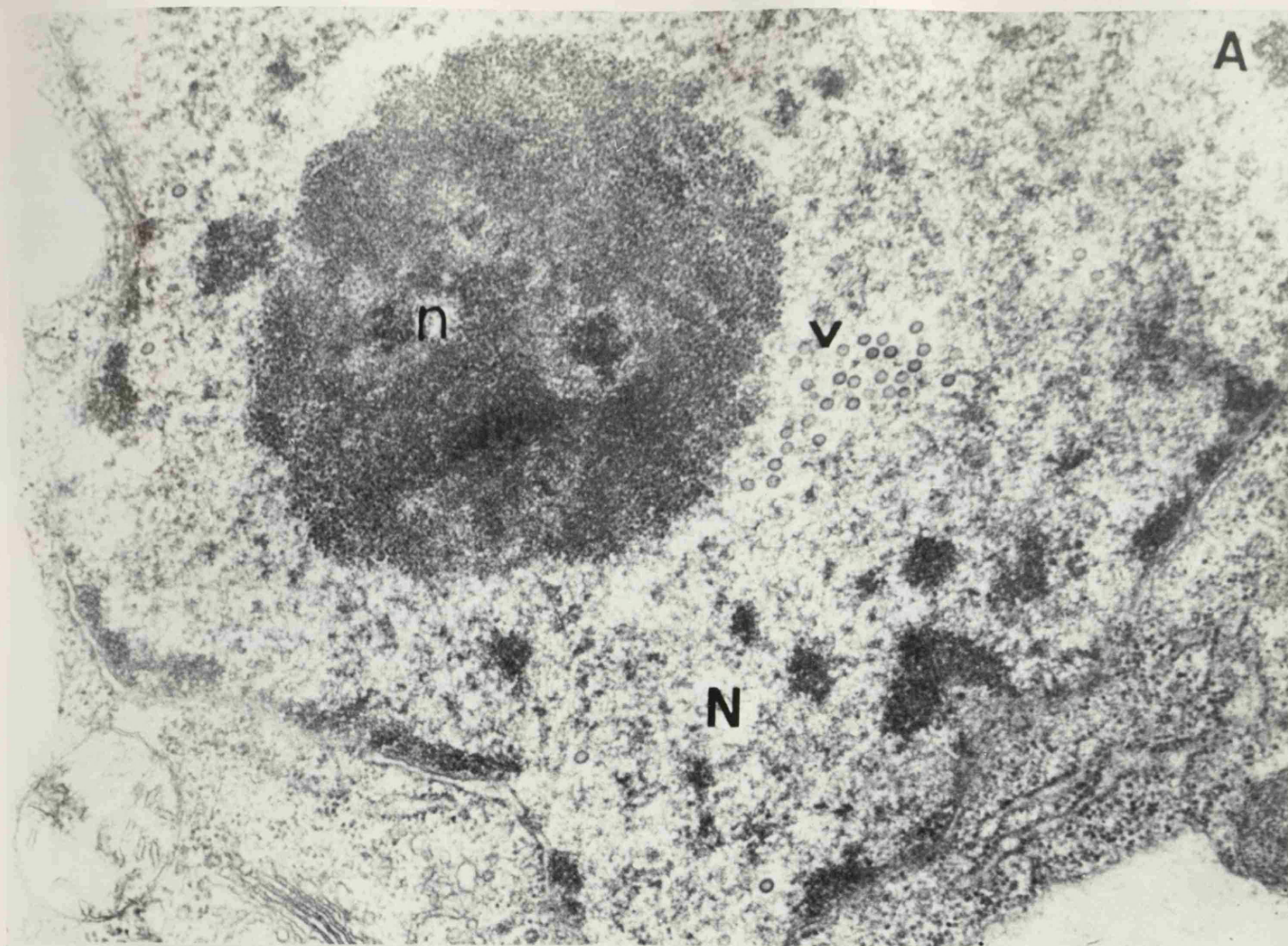


FIG. 26

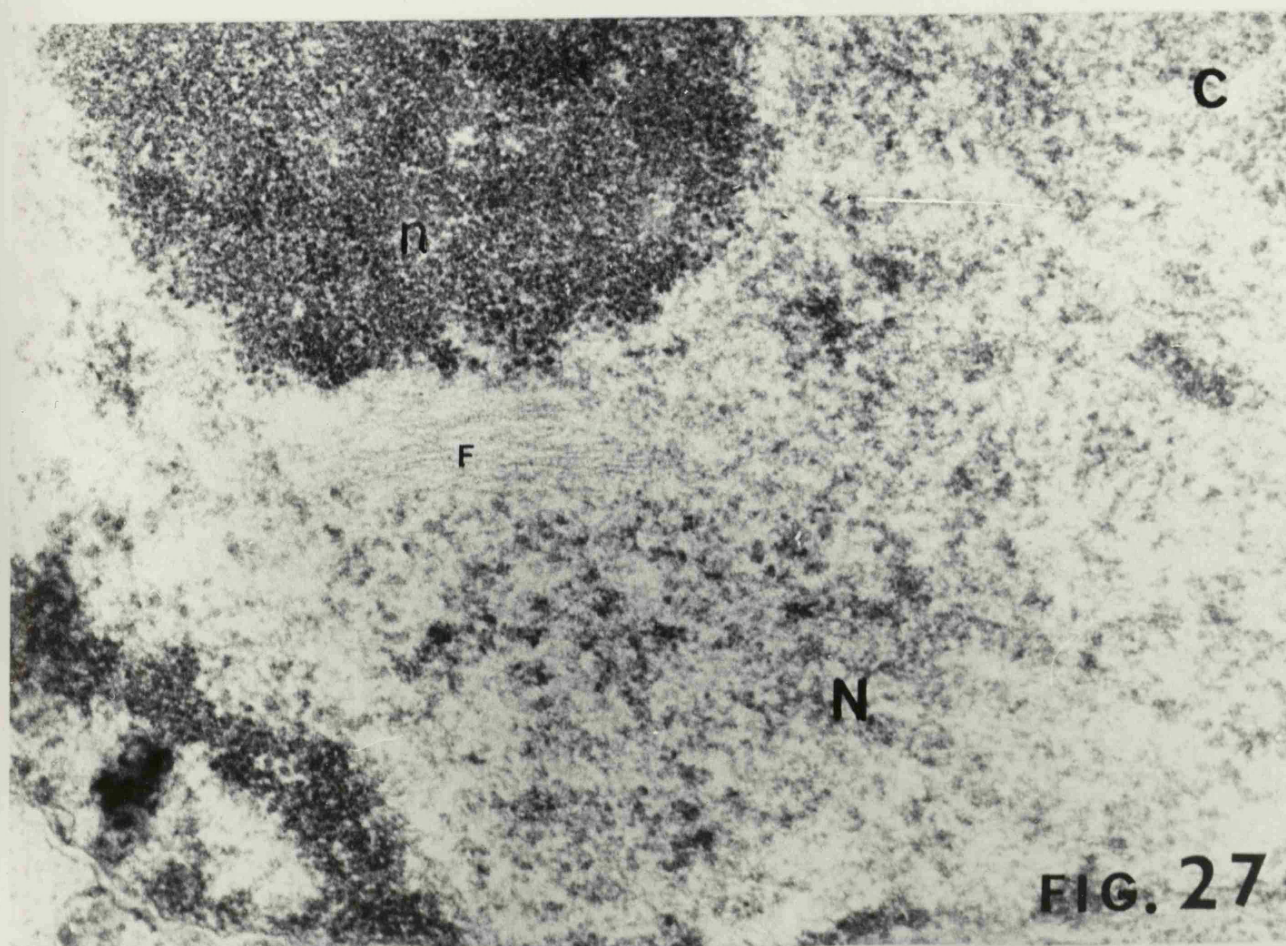
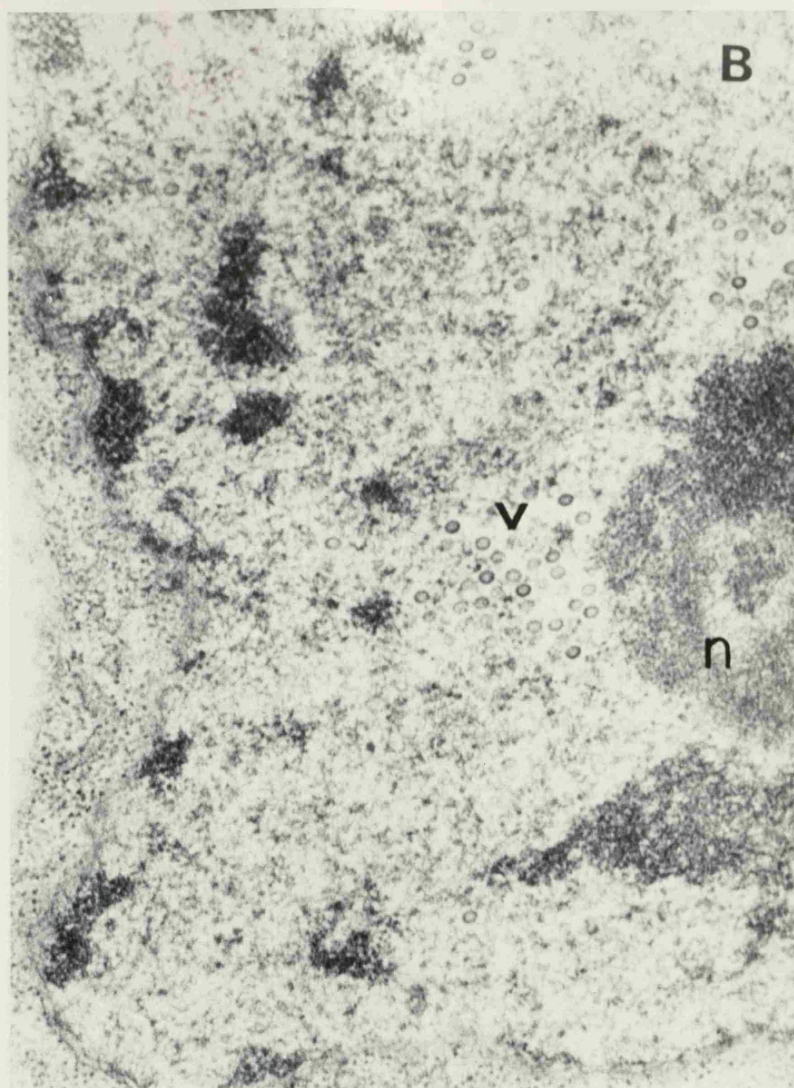
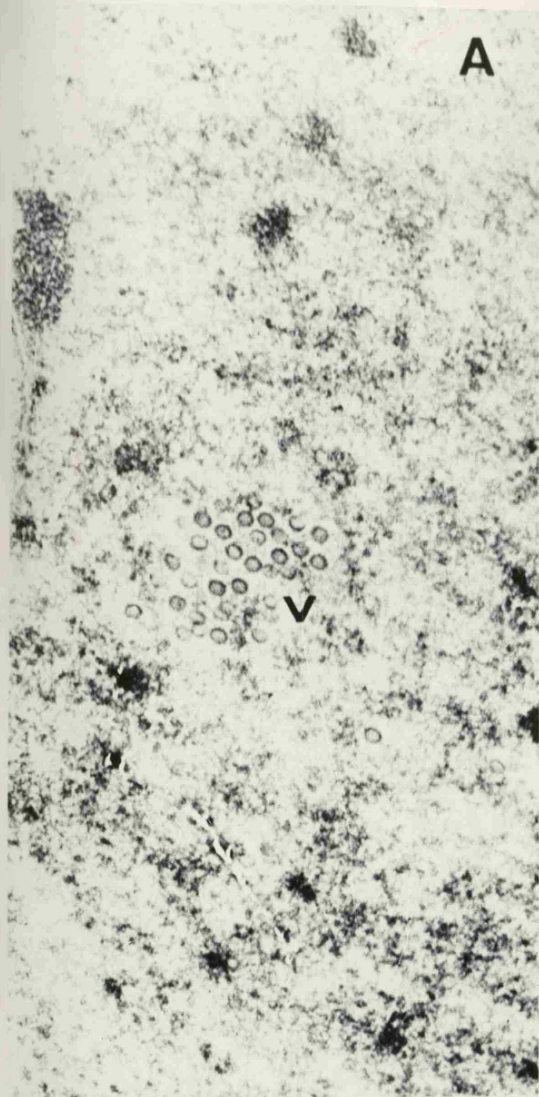


FIG. 27